

· 化学与分析 ·

基于 Q-Marker 成分定性与定量的双黄连制剂质量评价

王琼琚¹, 谢伟容^{1*}, 邵艳妮², 刘巧², 徐伟², 许文^{2*}

(1. 漳州卫生职业学院, 福建 漳州 363000; 2. 福建中医药大学 药学院 生物医药研发中心, 福州 350122)

【摘要】 目的: 基于中药质量标志物(Q-Marker)的新概念, 系统评估中药复方双黄连制剂(胶囊、颗粒、口服液)质量, 建立超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)快速鉴定双黄连制剂中的主要化学成分, 根据鉴定化学物质基础分析其生源途径、成分特异性及相关药理作用, 建立 HPLC-DAD 同时定量分析双黄连制剂中环烯醚萜苷类、有机酸类、木脂素类和黄酮类共计 22 种主要活性成分(新绿原酸, 绿原酸, 咖啡酸, 隐绿原酸, 马钱苷, 獐牙菜苷, 断氧化马钱苷, 芦丁, 野黄芩苷, 木犀草苷, 连翘脂苷A, 松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷, 异绿原酸 B, 异绿原酸A, 异绿原酸 C, 黄芩苷, 连翘苷, 木蝴蝶素A-7-葡萄糖醛酸苷, 汉黄芩苷, 黄芩素, 汉黄芩素, 千层纸素A)的含量, 结合双黄连活性成分现代药理研究与化学计量学分析结果, 为双黄连质量 Q-Marker 的制定提供依据。方法: 定性分析采用 UPLC-Q-TOF-MS, Waters CORTECS C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.6 μ m), 流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B)梯度洗脱, 柱温 45 $^{\circ}$ C; 飞行时间质谱, 采用负离子模式扫描。定量分析采用 HPLC-DAD, 安捷伦 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸和 3% 甲醇的水溶液(B)梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C。二极管阵列检测器的检测波长为 240, 276, 326 nm。结果: UPLC-Q-TOF-MS 经过质谱精确质量数及对照品比对, 准确鉴定双黄连制剂中的 22 种化学成分(包括环烯醚萜苷类、有机酸类、木脂素类和黄酮类), 并以其为基础分析 Q-Marker 依据, 四类成分均具有代表性, 建立的 HPLC-DAD 同时测定 22 种双黄连制剂主要成分的定量分析方法, 在考察的浓度范围内, 与峰面积呈良好的线性关系($r > 0.999 0$); 回收率均在 95% ~ 106%, RSD 2.0% ~ 4.6%, 并且通过化学计量主成分分析结合 Marker 现代药理研究情况, 选择双黄连制剂的 Q-Marker。结论: 通过 UPLC-Q-TOF-MS 联用技术, 为鉴定双黄连制剂的化学成分提供了一种快速、高效的定性分析方法; 建立的 HPLC-DAD 同时测定双黄连中 4 大类共 22 种活性成分的定量分析方法准确, 可靠, 进一步筛选作为双黄连制剂的 Q-Marker 成分, 为全面评价双黄连制剂的质量提供参考。

【关键词】 双黄连制剂; 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱; 高效液相色谱-二极管阵列检测器; 质量控制; 中药质量标志物

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2017)18-0036-11

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180036

【网络出版地址】 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170612.1044.036.html>

【网络出版时间】 2017-06-12 10:44

Analysis of Q-Marker Constituents and Quality Evaluation in Shuanghuanglian Preparations by Qualitative and Quantitative Methods

WANG Qiong-jun¹, XIE Wei-rong^{1*}, TAI Yan-ni², LIU Qiao², XU Wei², XU Wen^{2*}

(1. Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, China;

2. Centre of Biomedical Research & Development, School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

【收稿日期】 20170322(001)

【基金项目】 福建省“高校新世纪优秀人才支持计划”课题项目(2015);福建省教育厅杰出青年科研课题项目(2016);福建中医药大学校管课题项目(X2015015-平台);福建省“大学生创新创业训练计划”项目(201610393030, 201610393083)

【第一作者】 王琼琚, 硕士, 副教授, 从事中药制剂研究, Tel:0596-2559520, E-mail:wqjzst@163.com

【通讯作者】 * 谢伟容, 硕士, 实验师, 从事中药制剂及质量评价研究, Tel:0596-2559522, E-mail:xieweirong@126.com;

* 许文, 博士, 助理研究员, 从事中药复方药效物质基础研究, Tel:0591-22861217, E-mail:yaouxuwen@qq.com

[Abstract] Objective: To systemically evaluate the quality of Chinese compound Shuanghuanglian preparations (SHL, including capsules, granules, and oral liquid) based on the new concept of Q-Marker. **Method:** A qualitative analytical method of ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was developed for quick identification of multi-constituents in SHL. The source, specificity and related pharmacological effects of chemical constituents were confirmed by analyzing biosynthetic pathway and component specificity. The qualitative assay was performed on a Waters CORTECS C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm) with the mobile phase consisting of acetonitrile (A) and 0.1% formic acid solution (B) as gradient elution at a flow rate of 0.25 mL · min⁻¹. The column temperature was 45 °C and Q-TOF-MS was used in negative ion mode. Secondly, an HPLC-DAD analytical method was developed for simultaneously determining 22 major compound (including neochlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, cryptochlorogenic acid, loganin, sweroside, secoxyloganin, rutin, scutellarin, luteoloside, forsythoside A, pinoresinol 4-*O*-β-*D*-glucopyranoside, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, baicalin, forsythin, oroxylin A-7-*O*-glucuronid, wogonoside, baicalein, wogonin and oroxylin A) in Shuanghuanglian preparations. The quantitative assay was performed on Angilent Eclipse XDB-C₁₈ with the mobile phase consisting of acetonitrile (A) and 3% methanol and 0.1% formic acid solution (B) as gradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was at 30 °C and the optimum detection wavelength of DAD was set at 240, 276 and 326 nm. **Result:** Based on the retention time and MS spectra, 22 compounds (including iridoid glycosides, organic acids, lignans, and flavonoids) in Shuanghuanglian preparations were unambiguously identified by comparing with reference substances. In quantitative assay, the linear range of 22 detected compounds was fine ($r > 0.999 0$), and the overall recoveries ranged from 95% to 106%, with the RSD ranging from 2.0% to 4.6%. Chemical principal component analysis and modern pharmacological research of Marker were used to select the Q-Marker of Shuanghuanglian preparation. **Conclusion:** The UPLC-Q-TOF-MS approach was used to provide a rapid and effective qualitative method for identifying the chemical components of Shuanghuanglian preparations; the established HPLC-DAD was reliable and accurate to quantitatively analyze 22 active compounds in Shuanghuanglian preparations, further screen Q-Marker of Shuanghuanglian preparations, and provide reference for their comprehensive quality evaluation.

[Key words] Shuanghuanglian preparations; UPLC-Q-TOF-MS; HPLC-DAD; quality control; Q-Marker

中药复方制剂质量控制是保证中成药临床用药安全性和有效性的重要措施,也是制约中药复方现代化进程的重要因素。由于中药复方制剂的复杂性,目前的质量标准研究仍比较薄弱,构建符合中药复方特点的质量控制体系,是当前中药复方制剂现代化进程中亟待解决的难题^[1]。刘昌孝院士提出了中药质量标志物(Q-Marker)的定义,指出Q-Marker存在于中药材及其相关产品(如中药饮片、中药煎剂、中药提取物、中成药制剂),是药材固有的或加工、制备过程中形成的,且与中药的功能属性密切相关的化学物质,因其是反映中药安全性、有效性的标志性物质,在研究中需要对其进行质量控制^[2]。Q-Marker理论的提出,为中药复方制剂的质量控制提供新的思路与参考,将在今后的中药及复方制剂质量控制研究制定中发挥重要的作用。

双黄连制剂是由金银花、黄芩和连翘3味中药

制备组成的复方制剂,具有疏风解表、清热解毒之功效。临床上用于外感风热所致的感冒,症见发热、咳嗽、咽痛,以及肺炎、上呼吸道感染等^[3]。在双黄连制剂的质量控制研究方面,2015年版《中国药典》一部只针对其中绿原酸、黄芩苷和连翘苷3个成分的含量进行测定,近年来针对其质量控制文献报道较多,殷爱玲等^[4]建立同时测定双黄连片中5种有效成分(绿原酸,连翘苷,连翘酯苷A,木犀草苷,芦丁)含量的UPLC-MS/MS分析方法,冯伟红等^[5]采用一测多评法与外标法测定双黄连制剂中4个黄酮类成分含量;笔雪艳等^[6]采用HPLC-UV-ELSD联用法测定双黄连系列制剂中连翘含量(连翘苷,木脂素类)并同时检查山银花;李文春等^[7]采用HPLC-DAD同时测定双黄连粉针剂中15种成分的含量,包括7个有机酸(新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,咖啡酸,连翘酯苷A,异绿原酸A,异绿原酸C),1个木

脂素(连翘苷)及 7 个黄酮(黄芩苷、千层纸素苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、木犀草苷和芦丁); LUAN 等^[8]采用 HPLC 结合化学计量学定量分析比较双黄连注射剂,检测了绿原酸、咖啡酸、异绿原酸、黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素共 6 个成分; YANG 等^[9]采用 HPLC 指纹图谱法结合 HPLC-DAD 多成分定量评价双黄连口服液,其测定了 3 个有机酸(绿原酸、咖啡酸、连翘酯苷 A), 1 个木脂素(连翘苷), 及 7 个黄酮类成分(芦丁、木犀草苷、芹菜素、黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素)共 11 个成分。 CHEN 等^[10]采用 3 通道等度洗脱模式的 HPLC-ECD 同时分析双黄连制剂中 11 种成分包括 7 个有机酸(咖啡酸,绿原酸,隐绿原酸,新绿原酸,异绿原酸 B, 异绿原酸 C, 连翘酯苷 A)和 4 个黄酮(野黄芩苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素)。 LI 等^[11]采用 HPLC-DAD 结合化学计量学,定量分析了双黄连口服液中绿原酸、连翘苷、黄芩苷 3 个成分含量。上述研究在双黄连制剂质量控制中发挥了重要的作用,但均没有根据 Q-Marker 的理论进行整理分析,提出真正的 Q-Marker,没有归纳整理双黄连制剂质控的指标。因此,本研究以双黄连为研究对象,在 Q-Marker 的理论及实例^[1-2, 12]指导下,构建双黄连制剂化学物质基础、质量标志物、质控方法。

另外,针对 Q-Marker 研究的技术,课题组前期采用液相色谱串联高分辨率飞行时间质谱(LC-Q-TOF-MS)技术用于中药复方物质基础的鉴定,为双黄连制剂的 Q-Marker 化学成分鉴定^[13-16]奠定了基础,通过色谱分离,串联高分辨质谱精确质量数定性优势,可以对中药及复方化学物质基础进行全面而准确的鉴定。故本文采用 UPLC-Q-TOF-MS 对双黄连制剂(口服液、胶囊和颗粒)化学成分进行全面定性分析,根据质谱鉴定的结果进一步采用 HPLC-DAD 法鉴定其成分:包括 3 种环烯醚萜苷(断氧化马钱苷、獐牙菜苷、马钱苷), 8 种有机酸(新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,咖啡酸,异绿原酸 B, 异绿原酸 A, 异绿原酸 C 和连翘酯苷 A), 2 种木脂素(连翘苷和松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷)及 9 种黄酮(芦丁、野黄芩苷、木犀草苷、黄芩苷、木蝴蝶素 A-7-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A)共计 22 种成分进行同时定量研究,结合药理药效及化学计量学分析,为双黄连制剂的 Q-Marker 确定及全面质量评价提供参考。

1 材料

MicroTOF 飞行时间质谱仪(德国 Bruker 公

司), 1290 系列超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), CPA225D 型 1/10 万分析天平(德国 Sartorius 公司), KQ-500E 型台式超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 甲酸、甲醇、乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司), Milli-Q 系列超纯水仪(美国 Millipore 公司), 其余试剂均为分析纯。

对照品断氧化马钱苷(批号 HL163399), 獐牙菜苷(批号 HS163397), 马钱苷(批号 HL163398)均由宝鸡市辰光生物有限公司提供; 新绿原酸(批号 SH906332), 绿原酸(批号 SH327979), 隐绿原酸(批号 SH905997), 咖啡酸(批号 SH331395), 异绿原酸 B(批号 SH14534613), 异绿原酸 A(批号 SH2450535), 异绿原酸 C(批号 SH32451880)均由北京赛百草科技有限公司提供; 松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷(批号 A0862), 芦丁(批号 A0103), 木犀草苷(批号 A0109), 连翘酯苷 A(批号 A0590), 连翘苷(批号 A0272), 野黄芩苷(批号 A0017), 黄芩苷(批号 A0016), 汉黄芩苷(批号 A0595), 黄芩素(批号 A0018), 汉黄芩素(批号 A0502)均由成都曼思特生物科技有限公司提供; 千层纸素 A(批号 E-0635)和木蝴蝶素 A-7-葡萄糖醛酸苷(批号 E-0783)由上海同田生化有限公司提供, 对照品的纯度均 >98.0%。

10 个批次双黄连制剂, 其中双黄连颗粒(规格 5 g/袋, 口服 1 次 2 袋, 1 日 3 次), S1, S2(批号 150822, 141201, 哈尔滨儿童制药厂有限公司), S3(批号 150653, 哈药集团中药二厂); 双黄连胶囊(规格 0.4 g/粒, 口服 1 次 4 粒, 1 日 3 次), S4, S5, S6(批号 1141101, 1150105, 140406, 河南天方药业中药有限公司); 双黄连口服液(规格 10 mL/支, 口服 1 次 2 支, 1 日 3 次), S7(批号 15111311, 收河南福森药业有限公司), S8(批号 20160102, 黑龙江省林宝药业有限责任公司), S9(批号 150227012, 河南太龙药业股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 UPLC-Q-TOF-MS 分析 色谱条件 Waters CORTECS C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B), 梯度洗脱(0 ~ 0.5 min, 3% A; 0.5 ~ 2 min, 3% ~ 8% A; 2 ~ 4 min, 8% ~ 15% A; 4 ~ 6 min, 15% ~ 20% A; 6 ~ 10 min, 20% ~ 30% A; 10 ~ 12 min, 30% ~ 45% A; 12 ~ 13 min, 45% ~ 70% A; 13 ~ 15 min, 70% A), 流速 0.25 mL·min⁻¹, 柱温 45 °C, 进样量 1 μL。

2.1.2 质谱条件 飞行时间质谱采用电喷雾负离子模式,毛细管电压 4.5 kV,喷雾器压力 0.2 mPa,干燥气体(N_2)流速 $4.0 L \cdot min^{-1}$,干燥气体温度 $180 \text{ }^\circ\text{C}$,四级杆离子能量 3.0 eV ,离子传输时间 $100 \text{ } \mu\text{s}$,前脉冲存储时间 $5 \text{ } \mu\text{s}$,碰撞气体氩气,碰撞能量 25 eV 。质谱测定数据采用全扫描模式采集,数据采集范围 m/z $100 \sim 1\ 500$ 。

2.1.3 HPLC-DAD 定量分析 色谱条件安捷伦 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \text{ } \mu\text{m}$),流动相为乙腈(A)-含 0.1% 甲酸和 3% 甲醇的水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 3% ~ 5% A; 10 ~ 20 min, 5% A; 20 ~ 35 min, 5% ~ 10% A; 35 ~ 40 min, 10% ~ 13% A; 40 ~ 82 min, 13% ~ 18% A; 82 ~ 90 min, 18% ~ 25% A, 90 ~ 100 min, 25% ~ 65% A, 100 ~ 105 min, 65% ~ 70% A),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,检测波长 240, 276, 326 nm,进样量 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。

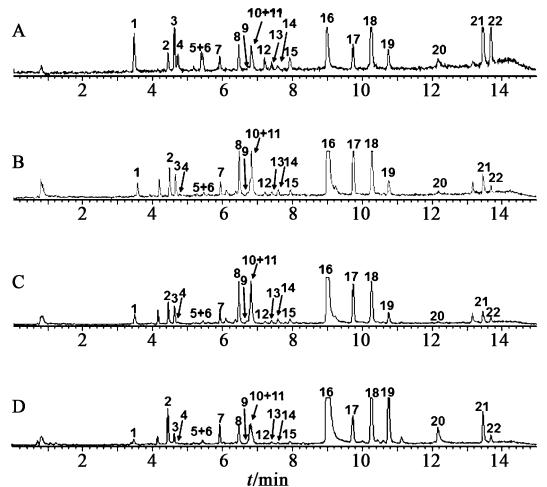
2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取双黄连颗粒 2.5 g,双黄连胶囊粉 0.4 g,精密移取双黄连口服液 5 mL,分别置于 50 mL 量瓶中,先加 50% 甲醇 40 mL 超声(功率 250 W,频率 50 kHz)提取 30 min,静置,放冷,再用 50% 甲醇定容,摇匀,静置,取上清液过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜,取续滤液,既得。

2.2.2 对照品溶液的制备 取新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,咖啡酸,獐牙菜苷,马钱苷,断氧化马钱苷,芦丁,连翘脂苷 A,野黄芩苷,木犀草苷,松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷,异绿原酸 B,异绿原酸 A,异绿原酸 C,黄芩苷,连翘苷,木蝴蝶素 A-7-葡萄糖酸苷,汉黄芩苷,黄芩素,汉黄芩素,千层纸素 A 对照品,精密称定,加入甲醇制备含 0.501, 0.411, 0.512, 0.09, 1.501, 1.501, 0.266, 0.401, 1.011, 0.521, 0.401, 1.012, 0.991, 1.25, 1.12, 3.98, 1.98, 1.021, 0.45, 0.521, 0.178, 1.981 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液,其他不同质量浓度的混合对照品溶液由 50% 甲醇稀释储备液得到。另精密称取上述各对照品,用 50% 甲醇分别制备含 0.996 3, 2.164, 0.978 5, 0.121 3, 0.096 9, 0.706 8, 1.216, 0.387 9, 2.061, 0.362 0, 0.100 0, 1.834, 0.741 3, 0.372 0, 1.420, 29.82, 3.650, 2.044, 0.2676, 0.642 4, 0.201 4, 0.911 6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单一对照品溶液,供加样回收率试验。

2.3 双黄连化学物质组辨识 双黄连颗粒、胶囊和口服液样品在 2.1.1 项下色谱条件及 2.1.2 项下质

谱条件进行分析,双黄连的 UPLC-Q-TOF-MS 总离子流图见图 1。化合物的鉴定方法:首先,根据总离子流色谱峰上所提取的精确质量数信息,通过 Compass Data Analysis Smart Formula Manually 软件在 5 ppm 的质量偏差范围内计算其精确分子式,对各化合物进行初步鉴定。其次,选择分子离子峰进行碰撞诱导解离(CID),通过二级质谱的裂解,获得化合物相应的碎片离子,根据离子的裂解情况并结合文献进一步比对推测;第三,由于所鉴定成分间同分异构体很多,并且表现出相似的质谱裂解行为,因此对所鉴定的成分进行对照品比对来进一步确定。以 16 号峰为例来说明鉴定过程:首先根据 TOF-MS 给出的分子离子峰 445.077 8,质谱软件计算出精确分子式为 $C_{21}H_{18}O_{11}$,与化学成分黄芩苷分子式一致,故初步推测其为黄芩苷或其异构体。再根据 TOF-MS 二级碎片离子有 m/z 269.175,与文献[13]报道黄芩苷二级质谱离子相一致,并且经裂解推测二级质谱图上 m/z 269 为黄芩苷失去葡萄糖醛酸离子峰 $[M - H - \text{glucuronide}]^-$, m/z 175 为葡萄糖醛酸离子峰 $[\text{glucuronide} - H]^-$,并且经过对照品比对其色谱保留时间、分子离子峰和二级质谱碎片与黄芩苷对照品完全一致,故鉴定该化合物为黄芩苷。其他化合物采用类似鉴定方法,最终从双黄连制剂中准确鉴定 4 大类(有机酸类、黄酮类、环烯醚萜苷类和木脂素类)共计 22 个成分,结果见表 1。经过 3 种制剂质谱比较,所鉴定 22 种成分为双黄连制剂的共有峰(图 1 中色谱峰标号对应于表 1 峰号),初步阐明了双黄连制剂的化学物质组辨识。



A. 混合对照品; B. S7; C. S1; D. S4
图 1 混合对照品和双黄连制剂样品 UPLC-Q-TOF-MS 的总离子流
Fig. 1 UPLC-Q-TOF-MS total ion chromatogram of reference Shuanghuanglian preparations in negative ion mode

表 1 双黄连各化学成分的鉴定分析

Table 1 Qualitative analysis of chemical constituents in Shuanghuanglian preparations

峰号	t_R /min	化合物	分子式	测定值 m/z	δ	二级质谱 m/z	来源
1 ^[17]	3.47	新绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 1	-0.57	191, 173, 135	FL
2 ^[17]	4.44	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 6	0.85	191, 173, 135	FL
3 ^[17]	4.62	隐绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 6	0.85	191, 173, 135	FL
4 ^[17]	4.76	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	179.034 0	-1.12	135	FL
5 ^[17]	5.39	马钱苷 ¹⁾	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	435.150 8	1.15	345, 227, 209	FL
6 ^[17]	5.44	獐牙菜苷 ¹⁾	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	403.124 3	0.74	195, 179	FL
7 ^[17]	5.92	断氧化马钱苷	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	403.124 9	2.23	371, 241, 223	FL
8 ^[17]	6.46	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.145 1	-0.82	301	FL, FF
9 ^[18]	6.70	野黄芩苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	461.071 3	-1.52	285	RS
10 ^[17]	6.79	木犀草苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	447.093 6	1.79	285	FL
11 ^[19]	6.82	连翘脂苷 A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623.198 0	0.64	461, 179, 161	FF
12 ^[17]	7.20	异绿原酸 B	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.119 7	1.36	353, 191, 179	FL
13 ^[17]	7.40	异绿原酸 A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.119 9	1.75	353, 191, 179	FL
14 ^[19]	7.59	松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	519.187 3	1.35	357	FF
15 ^[17]	7.92	异绿原酸 C	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.119 5	0.97	353, 191, 179	FL
16 ^[20]	8.99	黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445.077 8	1.57	269, 175	RS
17 ^[19]	9.74	连翘苷 ¹⁾	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	579.206 7	-1.55	533, 371	FF
18 ^[20]	10.25	木蝴蝶素 A-7-葡萄糖醛苷	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	459.093 3	1.09	283, 175	RS
19 ^[20]	10.74	汉黄芩苷	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	459.093 6	1.74	283, 268	RS
20 ^[20]	12.16	黄芩素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 4	1.49	251, 241, 223, 197	RS
21 ^[20]	13.46	汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.060 8	0.35	268	RS
22 ^[19]	13.68	千层纸素 A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.060 9	0.71	268, 239, 166	RS

注: ¹⁾表示分子离子峰为[M + HCOOH - H]⁻峰, FL表示金银花, FF表示连翘, RS表示黄芩。

2.4 次生代谢产物生源途径及成分特异性分析

根据 2.3 项下“双黄连化学物质组辨识”LC-Q-TOF-MS 的鉴定结果,双黄连主要化学成分包括金银花的有机酸类、黄酮类、环烯醚萜苷类,黄芩的黄酮类成分及连翘的有机酸与木脂素类成分,其中金银花有机酸类代表性成分为绿原酸,其生源途径可能是羟基化的肉桂酰辅酶 A 奎宁酸肉桂酸羟基化转移酶 HQT 能催化咖啡酰辅酶 A 和奎宁酸生成绿原酸^[21-23]。其次,金银花中代表性黄酮类成分为木犀草素、木犀草苷等,其生源途径一般认为是由苯丙氨酸生成 4-coumaroyl-CoA, 然后与 malonyl-CoA 结合在 CHS 的作用下生产黄酮骨架结构查尔酮。在查尔酮异构酶作用下,形成 3 个碳环的黄酮骨架结构,最后在黄酮合酶(FSI 和 FSII)的作用下生成木犀草素^[24],第三,环烯醚萜苷类,其生物合成途径可分为异戊烯焦磷酸(IPP)与二甲烯丙基焦磷酸(DMAPP)前体形成;牻牛儿基二磷酸(GPP)法尼基焦磷酸(FPP),牻牛儿基牻牛儿基二磷酸(GGPP)等萜类骨

架构建和羟基化糖基化等后修饰反应等几个阶段^[25],虽然有机酸类、黄酮类、环烯醚萜苷类成分并非金银花的特异性成分,如有机酸绿原酸在菊花、牡荆根、三叶青等多种药用植物也有存在;黄酮类木犀草素成分分布也很广,在降香、独一味、菊花、水苦苣等药用植物中均存在;环烯醚萜苷类成分在龙胆、山茱萸、秦艽、獐牙菜等药物植物中也有分布,但是这三大类成分在金银花中不仅具有较高的含量,而且具有良好的活性,因此具备作为 Q-Marker 的依据。黄芩主要成分为黄酮类,虽然其生源途径与金银花的黄酮基本一致,但是黄芩黄酮又有其特殊性,如黄芩苷、黄芩素等黄酮类成分在黄芩属中分布较多,而其他中药则少有,可以作为黄芩的特异性成分,具备作为 Q-Marker 的依据。连翘主要成分为木脂素类和有机酸类,连翘木脂素是一类苯丙素的氧化偶联产物,其松脂醇中间体是在松脂醇的功能酶 DP 作用下,通过区域选择性和立体选择性的游离基而生成,并进一步经过基团修饰得到连翘各种木脂素类

成分^[26],如连翘苷等成分;而有机酸类成分的生源途径咖啡酰基部分可能类似于绿原酸类成分,而羟基苯乙基部分来源于酪氨酸或酪胺^[27],如连翘酯苷 A,这两类成分在连翘中含量很高,在其他植物中较少分布,因此可以作为连翘的特异性成分,具备作为 Q-Marker 的依据。

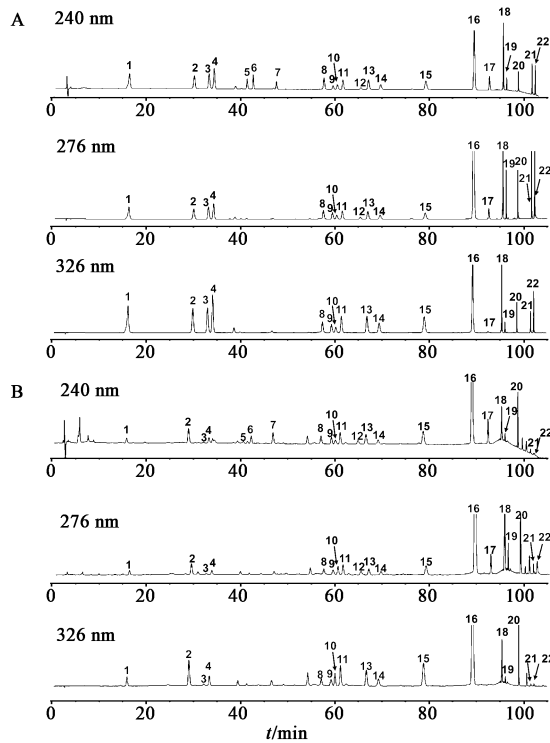
2.5 双黄连药效相关的 Q-Marker 的选择 根据 2.3 项下“双黄连化学物质组辨识”LC-Q-TOF-MS 的鉴定结果,对双黄连中主要化学成分的现代药理功效进行分析,以期双黄连 Q-Marker 的选择提供依据。首先,根据鉴定结果,有机酸类成分共 8 个,新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,咖啡酸,连翘酯苷 A,异绿原酸 B,异绿原酸 A 和异绿原酸 C,其中均以咖啡酰基奎宁酸结构单元为主,现代药理研究表明这类单体成分具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗病毒^[17, 28]等作用,与双黄连制剂的功效相一致,因此这类成分是药效相关的 Q-Marker;黄酮类成分共计 9 个,芦丁、野黄芩苷、木犀草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、木蝴蝶素 A-7-葡萄糖醛酸苷和千层纸素 A,其中黄芩的黄酮类成分如黄芩素、汉黄芩素、黄芩苷、千层纸素 A 具有调节免疫、抗炎^[29]、抗凝血作用^[30];芦丁具有抗炎作用^[31];环烯醚萜苷类共 3 个,断氧化马钱苷、马钱苷、獐牙菜苷,具有广泛的生物活性,如抗炎、抗病毒、抗菌、抗氧化等多种活性^[32-34],与双黄连制剂功效相一致,而查阅国内外文献,目前针对双黄连制剂中环烯醚萜苷的质量控制均未有报道。木脂素类共 2 个:连翘苷、松脂素-β-D-吡喃葡萄糖苷,同样具有抗菌、抗病毒等作用^[35-36],同样可以在双黄连制剂中发挥功效。因此,双黄连鉴定的化学成分均有药效下的 Q-Marker 特点,为了进一步了解这些成分的含量情况,开展了双黄连多指标质量评价的方法。

3 双黄连质量评价方法的建立

3.1 双黄连 HPLC-DAD 质量标志物定量测定方法的建立

3.1.1 系统适应性及专属性试验 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各 10 μL,在 2.1.3 项色谱条件下分析,结果见图 2。新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,咖啡酸,獐牙菜苷,马钱苷,断氧化马钱苷,芦丁,连翘脂苷 A,野黄芩苷,木犀草苷,松脂素-β-D-吡喃葡萄糖苷,异绿原酸 B,异绿原酸 A,异绿原酸 C,黄芩苷,连翘苷,木蝴蝶素 A-7-葡萄糖醛酸苷,汉黄芩苷,黄芩素,汉黄芩素和千层纸素 A 共 22 种分析物在相应测定波长下与其相邻色谱峰的分度

均 > 1.5,拖尾因子在 0.95 ~ 1.10,理论塔板数以各色谱峰计均在 1 万以上。阴性对照,除芦丁为金银花和连翘共有成分外,其他成分在相应位置上未见色谱峰,说明其他组分不干扰定量测定。



1. 新绿原酸; 2. 绿原酸; 3. 咖啡酸; 4. 隐绿原酸; 5. 马钱苷; 6. 獐牙菜苷; 7. 断氧化马钱苷; 8. 芦丁; 9. 野黄芩苷; 10. 木犀草苷; 11. 连翘脂苷 A; 12. 松脂素-β-D-吡喃葡萄糖苷; 13. 异绿原酸 B; 14. 异绿原酸 A; 15. 异绿原酸 C; 16. 黄芩苷; 17. 连翘苷; 18. 木蝴蝶素 A-7-葡萄糖醛酸苷; 19. 汉黄芩苷; 20. 黄芩素; 21. 汉黄芩素; 22. 千层纸素 A

图 2 混合对照品(A), S7 双黄连样品(B)的 HPLC-DAD 色谱
Fig. 2 HPLC-DAD chromatograms of reference substances(A) and Shuanghuanglian preparations(B)

3.1.2 线性范围和范围考察 取 2.2.2 项下方法制备各对照品储备液,用 50% 甲醇稀释,配制系列梯度浓度的混合对照品溶液。精密吸取 10 μL,依次注入液相色谱仪,在 2.1.3 项色谱条件下测定峰面积,以峰面积(Y)对对照品浓度(X)作线性回归,绘制标准曲线,得到回归方程和相关系数,结果见表 2。

3.1.3 精密度试验 精密吸取同一份对照品混合溶液 10 μL,在 2.1.3 项色谱条件下 1 d 内连续进样 6 次,连续测定 3 d,分别记录 22 种成分的峰面积,计算峰面积的 RSD,结果 22 种成分日内精密度 RSD 0.2% ~ 3.5%,日间精密度 RSD 0.6% ~ 3.4%,表明仪器精密度良好。

3.1.4 稳定性试验 取本品按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 6, 10, 12, 24 h 注入 HPLC 色

表 2 22 种成分的线性范围

Table 2 Calibration curves, linear ranges of 22 detected compounds

成分	回归方程	线性范围/mg·L ⁻¹	r
新绿原酸	$Y = 27.72X + 64.74$	0.501 ~ 150.3	0.999 4
绿原酸	$Y = 27.98X + 37.32$	0.411 ~ 123.1	0.999 2
隐绿原酸	$Y = 25.86X + 20.94$	0.512 ~ 153.2	0.999 4
咖啡酸	$Y = 74.08X - 2.160$	0.090 ~ 27.01	0.999 3
马钱苷	$Y = 12.40X + 6.167$	1.501 ~ 450.3	0.999 2
獐牙菜苷	$Y = 7.299X + 3.769$	1.501 ~ 450.3	0.999 4
断氧化马钱苷	$Y = 15.89X + 4.161$	0.266 ~ 79.80	0.999 0
芦丁	$Y = 16.62X - 4.350$	0.401 ~ 120.3	0.999 4
连翘脂苷 A	$Y = 18.84X + 7.973$	1.011 ~ 303.2	0.999 3
野黄芩苷	$Y = 17.15X - 3.223$	0.521 ~ 156.2	0.999 0
木犀草苷	$Y = 26.99X + 4.943$	0.401 ~ 120.4	0.999 1
松脂素-β-D-吡喃葡萄糖苷	$Y = 2.764X + 14.63$	1.012 ~ 303.1	0.999 0
异绿原酸 B	$Y = 41.84X - 5.060$	0.991 ~ 297.1	0.999 5
异绿原酸 A	$Y = 40.30X - 13.00$	1.250 ~ 375.0	0.999 5
异绿原酸 C	$Y = 36.98X - 22.91$	1.120 ~ 336.0	0.999 4
黄芩苷	$Y = 32.94X + 988.1$	3.980 ~ 1194	0.999 0
连翘苷	$Y = 9.973X - 11.02$	1.980 ~ 594.1	0.999 4
木蝴蝶素 A-7-葡萄糖酸苷	$Y = 39.09X - 12.91$	1.021 ~ 306.2	0.999 4
汉黄芩苷	$Y = 53.61X + 41.83$	0.450 ~ 135.0	0.999 4
黄芩素	$Y = 72.07X - 27.71$	0.521 ~ 156.3	0.999 4
汉黄芩素	$Y = 61.83X - 8.991$	0.178 ~ 53.40	0.999 4
千层纸素 A	$Y = 5.514X - 4.258$	1.981 ~ 594.1	0.999 4

谱仪,记录 22 种成分峰面积,经计算 22 种成分峰面积 RSD 在双黄连口服液、双黄连颗粒剂和双黄连胶囊剂中分别为 0.4% ~ 3.2%, 0.2% ~ 3.5% 和 0.5% ~ 3.4%,结果表明双黄连样品在 24 h 内稳定。

3.1.5 重复性试验 精密称取同一批双黄连样品(S1, S4, S7),每种剂型样品各 6 份,按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液,依法测定峰面积,计算 22 种成分的含量,经计算 22 种成分含量 RSD 在双黄连口服液、双黄连颗粒剂、双黄连胶囊剂中分别为 1.7% ~ 3.6%, 1.6% ~ 4.0% 和 1.3% ~ 4.4%,说明该方法重复性良好。

3.1.6 回收率试验 精密称取 3.1.5 项下已知含量的同批次双黄连颗粒剂约 1.25 g,胶囊约 0.2 g,精密量取双黄连制剂口服液约 2.5 mL,每种剂型样品各 6 份,精密加入近似等量的 22 种对照品,按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液,依法测定含量,结果表明双黄连口服液测定回收率为 95.15% ~ 105.42%,RSD 范围 2.0% ~ 3.0%;双黄连颗粒测定回收率为 95.98% ~ 105.97%,RSD 范围 2.0% ~ 4.2%;双黄连胶囊测定回收率为 95.09% ~ 103.76%,RSD 范围 2.2% ~ 4.7%。双黄连制剂总体回收率为 95.09% ~ 103.70%,RSD 范围 2.1% ~

4.6%,见表 3。

3.1.7 样品含量测定 分别精密称取或者量取不同批次的双黄连样品,按 2.2.1 项下方法制备供试品溶液,进样 10 μL,按 2.1.3 项色谱条件下测定峰面积,根据标准曲线计算其含量,结果见表 4。

3.2 双黄连 HPLC-DAD 多质量标志物成分定量化学计量学——主成分分析 采用 DPS 16.0 数理统计软件对 22 种成分的含量进行主成分分析,对 6 批双黄连颗粒和 3 批双黄连口服液中贡献最大的关键成分进行识别,见图 3,其主成分 $y = 0.226 4 x_1 + 0.231 2 x_2 + 0.216 7 x_3 + 0.228 1 x_4 + 0.219 1 x_5 + 0.227 7 x_6 + 0.209 3 x_7 + 0.198 2 x_8 + 0.200 9 x_9 + 0.229 9 x_{10} + 0.153 8 x_{11} + 0.214 7 x_{12} + 0.189 0 x_{13} + 0.224 4 x_{14} + 0.206 0 x_{15} + 0.230 1 x_{16} + 0.216 1 x_{17} + 0.230 4 x_{18} + 0.178 1 x_{19} + 0.215 7 x_{20} + 0.225 5 x_{21} + 0.200 2 x_{22}$,由该式分析可知,22 种化合物对双黄连含量贡献,其中有机酸类的贡献为绿原酸 > 咖啡酸 > 新绿原酸 > 异绿原酸 A > 隐绿原酸 > 异绿原酸 C > 连翘酯苷 A > 异绿原酸 B;黄酮类成分含量贡献为黄芩苷、木蝴蝶素 A-7-葡萄糖酸苷 > 汉黄芩素 > 黄芩素 > 千层纸素 A > 芦丁 > 汉黄芩苷;环烯醚萜苷类共 3 个为獐牙菜苷 > 马钱苷 > 断氧化马钱苷;

表 3 双黄连制剂中 22 种成分的加样回收率 (n=6)

Table 3 Recoveries of 22 detected compounds in Shuanghuanglian preparations (n=6)

成分	双黄连颗粒 (S3)				双黄连胶囊 (S4)				双黄连口服液 (S7)			
	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
新绿原酸	0.501	1.073	102.80	3.1	0.501	1.023	103.50	3.1	1.002	1.989	99.08	2.1
绿原酸	2.055	4.291	103.50	2.0	2.055	3.949	99.78	2.5	2.055	4.046	97.61	2.9
隐绿原酸	1.024	2.049	104.50	2.1	0.768	1.518	99.59	3.9	1.024	1.943	97.41	2.2
咖啡酸	0.060	0.124	101.00	4.1	0.090	0.189	100.10	2.3	0.090	0.210	98.31	2.7
马钱苷	0.500	0.543	98.91	3.2	0.094	0.193	101.90	2.1	0.094	0.169	101.80	3.1
獐牙菜苷	0.300	0.520	96.96	2.2	0.751	1.427	95.97	3.1	0.250	0.461	97.20	2.3
断氧化马钱苷	0.532	1.161	95.98	2.2	0.399	0.789	102.60	2.3	1.330	2.482	95.24	3.0
芦丁	0.401	0.795	101.60	2.3	0.267	0.548	101.80	4.1	0.100	0.175	96.18	2.4
连翘脂苷 A	1.517	3.212	101.00	4.2	0.809	1.579	95.78	4.6	2.022	4.035	97.65	2.2
野黄芩苷	0.261	0.526	105.40	3.1	0.417	0.779	100.00	3.2	0.208	0.410	95.87	2.5
木犀草苷	0.080	0.158	101.10	3.6	0.020	0.043	99.55	3.2	0.100	0.197	97.00	3.0
松脂素-β-D-吡喃葡萄糖苷	1.822	3.733	104.20	3.4	0.810	1.711	103.70	2.5	1.265	2.537	100.90	2.2
异绿原酸 B	0.124	0.251	104.80	2.1	0.991	1.067	97.73	2.1	0.991	1.726	99.39	3.1
异绿原酸 A	0.156	0.308	105.20	2.5	0.156	0.330	101.80	2.7	0.313	0.691	102.10	2.9
异绿原酸 C	0.373	0.765	103.46	4.0	0.224	0.463	99.71	3.2	1.344	2.704	95.57	3.0
黄芩苷	31.840	62.180	103.50	2.3	31.840	60.090	95.09	4.1	31.840	61.550	102.80	2.5
连翘苷	3.960	7.844	105.97	3.0	0.990	2.048	102.50	3.0	0.990	1.990	100.30	2.0
木蝴蝶素 A-7-葡萄糖醛酸苷	1.532	3.337	104.10	2.2	2.042	3.978	96.77	2.2	2.042	4.001	95.88	2.4
汉黄芩苷	0.150	0.302	105.50	3.3	0.225	0.492	99.54	3.4	0.113	0.238	97.44	2.5
黄芩素	0.208	0.407	96.06	2.7	0.521	1.142	95.88	2.4	0.521	0.959	95.15	3.0
汉黄芩素	0.089	0.200	105.60	2.2	0.178	0.372	95.71	2.9	0.178	0.348	96.54	2.6
千层纸素 A	0.495	0.945	105.90	2.4	0.991	1.925	102.30	2.5	0.660	1.376	105.42	2.2

表 4 双黄连制剂中 22 种成分的质量分数 (n=3)

Table 4 Determination of 22 detected compounds in Shuanghuanglian preparations (n=3)

No.	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	马钱苷	獐牙菜苷	断氧化马钱苷	芦丁	连翘脂苷 A	野黄芩苷	木犀草苷
S1	0.446 1	1.731 0	0.782 8	0.051 1	0.038 8	0.182 8	0.520 0	0.310 3	1.344 0	0.201 0	0.061 5
S2	0.424 4	1.548 0	0.754 2	0.070 2	0.083 4	-	0.449 1	0.901 5	3.305 0	0.177 9	0.140 9
S3	0.269 7	1.855 0	0.457 5	0.079 4	-	0.271 9	0.171 9	0.258 0	1.866 0	0.424 6	0.124 4
S4	2.519 0	9.494 0	3.766 0	0.495 1	0.484 5	3.534 0	1.897 0	1.380 0	4.022 0	1.810 0	0.113 9
S5	2.347 0	10.900 0	4.314 0	0.713 3	0.317 7	4.221 0	3.584 0	0.996 9	4.486 0	2.267 0	0.232 6
S6	1.469 0	8.101 0	1.357 0	0.560 3	0.312 0	2.147 0	3.542 0	0.745 6	2.516 0	1.463 0	0.403 3
S7	0.398 5	0.816 2	0.378 2	0.048 5	0.029 5	0.087 2	0.486 3	0.031 6	0.824 3	0.084 0	0.040 0
S8	0.489 7	0.392 7	0.547 0	0.051 3	0.056 3	0.335 2	0.795 0	0.045 9	1.618 0	0.109 8	0.041 2
S9	0.200 2	0.755 4	0.367 5	0.035 1	-	-	0.387 9	0.059 1	1.527 0	0.073 5	0.070 4
S1	1.467 0	0.096 7	0.115 0	0.303 0	23.380 0	2.920 0	1.394 0	0.114 7	0.165 7	0.084 4	0.336 4
S2	2.343 0	0.151 3	0.172 3	0.469 1	28.280 0	3.399 0	1.683 0	0.256 2	0.402 4	0.131 7	0.536 5
S3	1.489 0	0.220 0	0.091 6	0.246 2	25.190 0	0.965 6	1.406 0	0.100 6	0.128 6	0.110 6	0.500 4
S4	4.356 0	0.490 6	0.854 7	1.199 0	149.100 0	5.165 0	10.010 0	1.338 0	3.212 0	1.007 0	4.558 0
S5	5.247 0	0.734 1	1.282 0	2.266 0	153.200 0	6.497 0	12.700 0	4.005 0	1.938 0	0.979 9	1.974 0
S6	2.317 0	0.212 1	0.569 1	0.795 2	137.300 0	4.966 0	10.170 0	6.155 0	2.518 0	1.057 0	2.512 0
S7	0.503 9	0.296 5	0.148 8	0.568 0	11.520 0	0.398 8	0.817 4	0.051 2	0.185 4	0.070 3	0.272 1
S8	0.459 7	0.210 1	0.121 6	0.404 8	13.410 0	1.070 0	0.962 9	0.195 9	0.107 5	0.058 6	0.151 5
S9	1.173 0	0.082 2	0.090 1	0.242 4	14.550 0	1.700 0	0.840 8	0.120 0	0.048 7	0.067 5	0.272 8

注: - 表示低于检测限。S1 ~ S6 单位为 mg·g⁻¹, S7 ~ S9 单位为 g·L⁻¹。

木脂素类共 2 个为连翘苷 > 松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷。其中绿原酸、黄芩苷、獐牙菜苷及连翘苷是双黄连含量贡献最大的成分。

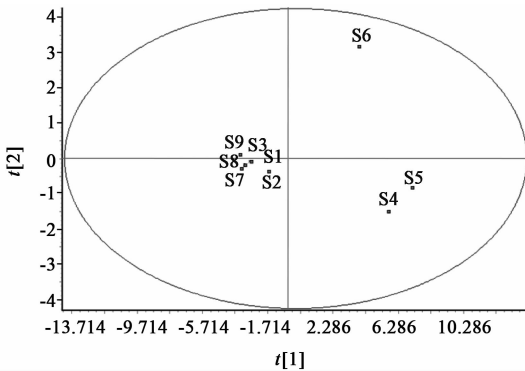


图 3 双黄连制剂中成分含量 PCA 分析

Fig. 3 Principal component analysis of Shuanghuanglian preparations

4 结果和讨论

4.1 UPLC-Q-TOF-MS 定性分析 比较了正、负离子检测模式,发现负离子模式下峰响应优于正离子模式,并且同时较多文献报道了负离子模式下金银花、黄芩和连翘药材的质谱解析,方便二级质谱的文献比对、质谱鉴定;流动相添加 0.1% 甲酸有利于峰形改善,并且有利于某些成分如连翘苷产生响应更好的 $[M + HCOOH - H]^-$ 分子离子峰;结构相似的同分异构体,其不仅分子式一样,而且有着类似的质谱裂解方式,如绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸,因此为了准确鉴定所推测的成分,课题组通过进一步购买相应的对照品来区分确认,最终共鉴定 22 个成分,其中有机酸类成分共 8 个,新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,咖啡酸,连翘酯苷 A,异绿原酸 B,异绿原酸 A 和异绿原酸 C;黄酮类成分共计 9 个,芦丁、野黄芩苷、木犀草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、木蝴蝶素 A-7-葡萄糖醛酸苷和千层纸素 A;环烯醚萜苷类共 3 个,断氧化马钱苷、马钱苷、獐牙菜苷;木脂素类共 2 个,连翘苷、松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷。从化学成分定性结果来看,不同双黄连剂型间成分基本一致,说明双黄连制剂定性层面的质量一致性评价基本符合要求。

4.2 色谱条件的选择 由于绿原酸及异绿原酸类成分结构相近,其色谱峰容易重叠,通过比较了 Waters X-select C_{18} , Ultimate XB- C_{18} , Phenomenex Luna C_{18} 等色谱柱对双黄连 22 种活性成分的分离效果,最终选择安捷伦 Agilent-XDB C_{18} 色谱柱。流动相系统的选择,先后试用了乙腈和甲醇流动相体系:结果

乙腈体系优于甲醇体系,通过调水相有机盐,发现 0.1% 的甲酸水效果较佳,但是其对马钱苷和獐牙菜苷分离效果不好,无法达到基线分离,而用甲醇体系分离时发现其对马钱苷和獐牙菜苷的效果较佳,因此在此基础上往水相中添加 1%, 3%, 5% 的甲醇进行比较,结果发现随着甲醇比例的升高,马钱苷和獐牙菜苷的分离效果越好,但是甲醇比例过高(5%)时,连翘酯苷 A 和附近的黄酮成分分离度又下降,因此最终选择流动相系统为乙腈-(0.1% 甲酸 + 3% 甲醇)水体系,梯度洗脱。检测波长的选择:经 DAD 全波长扫描,獐牙菜苷、马钱苷、断氧化马钱苷、连翘苷和松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷最大吸收波长在 240 ~ 245 nm,新绿原酸,绿原酸,隐绿原酸,咖啡酸,芦丁,野黄芩苷,木犀草苷,连翘酯苷 A,异绿原酸 B,异绿原酸 A,异绿原酸 C 最大吸收波长在 326 nm 左右,黄芩苷,汉黄芩苷,黄芩素,汉黄芩素,千层纸素 A,木蝴蝶素 A-7-葡萄糖醛酸苷最大吸收波长在 276 nm 左右,综合各个待测物的紫外响应值,最终选择以 240, 276, 326 nm 作为 22 种成分含量测定的检测波长。

4.3 根据 Q-Marker 的概念确定双黄连质控的指标及含量分析 通过双黄连化学物质组、生源途径特异性成分分析、化学成分药理作用分析、含量测定结果的化学计量学分析多层次相结合,笔者认为双黄连制剂主要活性成分为有机酸类、黄酮类、环烯醚萜苷类及木脂素类成分,并且四大类成分均具有双黄连临床疗效相关联的药理活性;对 9 批双黄连制剂含量测定,结果表明,黄芩苷是所有成分中含量最高,双黄连颗粒含有 23.38 ~ 28.28 $mg \cdot g^{-1}$ (233.8 ~ 282.8 mg /次口服剂量),双黄连胶囊含有 137.3 ~ 153.2 $mg \cdot g^{-1}$ (219.68 ~ 245.12 mg /次口服剂量),而双黄连口服液 11.52 ~ 14.55 $g \cdot L^{-1}$ (230.4 ~ 291 mg /次口服剂量),3 种制剂含量间的差异由其给药剂量不同而致,如果按照单次口服剂量来计算则互相接近,根据主成分分析结果黄芩苷和木蝴蝶素 A-7-葡萄糖醛酸苷的贡献最高,因此建议黄酮类成分的 Q-Marker 选择黄芩苷和木蝴蝶素 A-7-葡萄糖醛酸苷。其次,绿原酸,连翘酯苷 A,松脂素- β -D-吡喃葡萄糖、连翘苷和木蝴蝶素 A-7-葡萄糖醛酸苷含量较高,按照单次口服剂量计算各个批次 3 种剂型的均值达 10 mg 以上,其他成分则低于 10 mg ,其中主成分分析绿原酸贡献最大,绿原酸的二聚体异绿原酸 A 在二聚体中贡献最大,并且有文献报道其可以降解为绿原酸^[14],而连翘酯苷 A 是连翘的有

机酸特异性成分,因此建议绿原酸、异绿原酸 A 和连翘酯苷 A 作为双黄连制剂有机酸的 Q-Marker;第三,本次实验所测的 3 个环烯醚萜苷类,3 种剂型含量均值最高的均为断氧化马钱苷,并且其在每个双黄连制剂中均良好检出,而马钱苷或獐牙菜苷则某些批次含量未检出,因此,建议断氧化马钱苷作为双黄连制剂环烯醚萜苷的 Q-Marker。最后,连翘苷、松脂素- β -D-吡喃葡萄糖苷 2 个木脂素类成分含量均较高,并且同样具有显著的抗菌、抗病毒等活性,因此建议连翘苷、松脂素- β -D-吡喃葡萄糖作为双黄连木脂素类成分的 Q-Marker。

各批次双黄连制剂含量上略有差异,经过文献查找,可能是由于双黄连的提取原料来自不同产地、不同生境、不同来源或者不同炮制品所致^[37-41]。

综上,本文建立 UPLC-Q-TOF-MS 联用技术,共鉴定双黄连制剂中 22 个成分,建立 HPLC-DAD 同时测定双黄连制剂中 22 种成分的定量分析方法,通过结合化学成分生源途径特性分析、药理药效活性、化学计量学分析等研究双黄连制剂 Q-Marker 为综合评价双黄连制剂的质量提供参考。

[致谢]福建省中药学重点实验室平台对于工作人员及测定仪器的提供。

[参考文献]

[1] 张铁军,许浚,韩彦琪,等. 中药质量标志物(Q-Marker)研究:延胡索质量评价及质量标准研究[J]. 中草药,2016,47(9):1458-1467.

[2] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-Marker):中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药,2016,47(9):1443-1457.

[3] 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,2015:735-741.

[4] 殷爱玲,谈瑄忠. UPLC-MS/MS 同时测定双黄连片中 5 种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(19):57-59.

[5] 冯伟红,杨菲,王智民,等. 一测多评法与外标法测定双黄连制剂中黄酮类成分含量的比较分析[J]. 中国药理学杂志,2012,47(20):1665-1669.

[6] 笔雪艳,王宪平,张清波,等. HPLC-UV-ELSD 联用法测定双黄连系列制剂中连翘含量并同时检查山银花[J]. 药物分析杂志,2014,34(1):104-107.

[7] 李文春,孙永慧,解黎雯,等. HPLC 同时测定双黄连粉针剂中 15 种成分的含量[J]. 中国新药杂志,2014,23(22):2614-2618,2630.

[8] LUAN L, WANG G L, LIN R C. HPLC and chemometrics for the quality consistency evaluation of Shuanghuanglian injection [J]. J Chromatogr Sci,2014,

52(7):707-712.

[9] YANG D Z, AN Y Q, JIANG X L, et al. Development of a novel method combining HPLC fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional Chinese medicine preparation [J]. Talanta, 2011, 85(2):885-890.

[10] CHEN L M, Hakamata H, Kusu F, et al. Simultaneous determination of various bioactive redox components in Shuang-Huang-Lian preparations using a novel three-channelisocratic elution liquid chromatography with electrochemical detection system [J]. J Pharm Biomed Anal,2014,95(3):93-101.

[11] LI B Q, CHEN J, LI J J, et al. High-performance liquid chromatography with photodiode array detection and chemometrics method for the analysis of multiple components in the traditional Chinese medicine Shuanghuanglian oral liquid [J]. J Sep Sci, 2015, 38(24):4187-4195.

[12] 杨静,江振作,柴欣,等. 中药注射液“Q-Markers”的辨析研究——丹红注射液研究实例[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2016,18(12):2056-2061.

[13] ZHAO W L, HUANG X Q, LI X Y, et al. Qualitative and quantitative analysis of major triterpenoids in *Alismatis Rhizoma* by high performance liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry [J]. Molecules,2015,20:13958-13981.

[14] 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.

[15] 许文,傅志勤,林婧,等. HPLC-Q-TOF-MS 和 UPLC-QqQ-MS 的三叶青主要成分定性定量研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(22):4365-4372.

[16] XU W, HUANG M, LI H, et al. Chemical profiling and quantification of Gua-Lou-Gui-Zhi decoction by high performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2015, 986-987C:69-84.

[17] QI L W, CHEN C Y, LI P. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in *Flos Lonicerae Japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2009, 23(19):3227-3242.

- [18] LI J, WANG Y H, Smillie T J, et al. Identification of phenolic compounds from *Scutellaria lateriflora* by liquid chromatography with ultraviolet photodiode array and electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 63(7):120-127.
- [19] HAN J, YE M, GUO H, et al. Analysis of multiple constituents in a Chinese herbal preparation Shuang-Huang-Lian oral liquid by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(2):430-438.
- [20] HAN J, YE M, XU M, et al. Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine-Huangqin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 848(2):355-362.
- [21] Ulbrich B, Zenk M H. Partial purification and properties of hydroxycinnamoyl-CoA; Quinate hydroxycinnamoyl transferase from higher plants [J]. *Phytochem*, 1979, 18(6):929-933.
- [22] Rhodes M, Woollorton L. The enzymatic conversion of hydroxycinnamic acids to P-coumaroyl quinic and chlorogenic acids in tomato [J]. *Phytochem*, 1976, 15:947-951.
- [23] Villegas R, Kojima M. Purification and characterisation of hydroxycinnamoyl D-glucose quinate hydroxycinnamoyl transferase in the root of sweet potato, *Ipomoea batatas* Lam [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(19):8729-8733.
- [24] 徐晓兰. 灵芝三萜和金莲花绿原酸生物合成途径关键酶基因的挖掘及分析 [D]. 北京:北京协和医学院, 2013.
- [25] SUN P, SONG S, ZHOU L, et al. Transcriptome analysis reveals putative genes involved in iridoid biosynthesis in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(10):13748-13762.
- [26] 刘东雷, 徐绥绪, 刘凤书. 连翘属中木脂素成分生物合成研究进展 [J]. *中国药物化学杂志*, 1996, 6(3):68-73.
- [27] 颜芳, 曾光尧, 谭健兵, 等. 植物中苯乙醇苷类化合物研究进展 [J]. *中南药学*, 2013, 11(5):358-362.
- [28] GUO Y P, LIN L G, WANG Y T. Chemistry and pharmacology of the herb pair *Flos Lonicerae Japonicae-Forsythiae Fructus* [J]. *Chin Med*, 2015, 10(1):16.
- [29] LI C, LIN G, ZUO Z. Pharmacological effects and pharmacokinetics properties of *Radix Scutellariae* and its bioactive flavones [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2011, 32(8):427-445.
- [30] 刘春美, 唐于平, 郭建明, 等. 芩连四物汤化学物质基础及其抗凝血活性研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(9):54-58.
- [31] ZHOU W, CAI B, SHAN J, et al. Discovery and current status of evaluation system of bioavailability and related pharmaceutical technologies for traditional Chinese medicines-*Flos Lonicerae Japonicae-Fructus Forsythiae Herb* couples as an example [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12):28812-28840.
- [32] 马双成, 刘燕, 毕培曦, 等. 金银花药材中抗呼吸道感染环烯醚萜苷类成分的定量研究 [J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(8):1039-1042.
- [33] CHEN C Y, QI L W, LI H J, et al. Simultaneous determination of iridoids, phenolic acids, flavonoids, and saponins in *Flos Lonicerae* and *Flos Lonicerae Japonicae* by HPLC-DAD-ELSD coupled with principal component analysis [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(18):3181-3192.
- [34] 石建功, 李帅, 王素娟, 等. 金银花提取物, 其制备方法和应用: 中国, CN 01085795A [P]. 2007-12-12.
- [35] 魏晋宝, 杨光义, 陈欢, 等. 连翘苷的提取方法、药理毒理及药动学研究进展 [J]. *中国药师*, 2015, 18(12):2144-2148.
- [36] BAO J, DING R, ZOU L, et al. *Forsythiae Fructus* inhibits B16 melanoma growth involving MAPKs/Nrf2/HO-1 mediated anti-oxidation and anti-inflammation [J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(5):1043-1061.
- [37] 李丽, 张村, 肖永庆, 等. 黄芩饮片的产地加工方法研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(8):1-3.
- [38] 龙月红, 邢朝斌, 劳风云, 等. 高效液相色谱测定不同生境黄芩中的黄芩苷 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(6):97-100.
- [39] 辛华, 丰杰, 程若敏, 等. HPLC 测定不同产地金银花中绿原酸和木犀草苷 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(2):60-63.
- [40] 刘瑞, 张振秋, 李伟铭, 等. 连翘不同产地与不同炮制品中 4 种成分的含量测定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(14):83-86.
- [41] 王永香, 罗勇, 沈娟, 等. 不同产地加工方法对江苏省东海县种植基地金银花质量影响的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(14):2665-2669.

[责任编辑 顾雪竹]