·研究报告·

UHPLC-MS/MS 法测定新冠肺炎经验方寒湿郁肺汤中 11 种主成分的含量

崔莉莉[1,2], 陈　勇[1], 张蒙伟[1,2], 鄢红霞[1,3], 高守红[1], 陈万生[1]（1. 上海长征医院药学部, 上海 200000; 2. 宜春学院, 江西 宜春 336000; 3. 云南中医药大学, 云南 昆明 650000）

［摘要］ **目的**　建立测定寒湿郁肺汤中 11 个主成分含量的方法。**方法**　采用超高效液相色谱串联质谱法（UHPLC-MS/MS）, 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C_{18}（3.5 μm, 2.1 mm×150 mm ）, 流动相为 0.2% 甲酸-10 mmol/L 醋酸铵水溶液（A）-乙腈（B）, 梯度洗脱 (0 ~ 0.6 min, 80% ~ 40%A; 0.6 ~ 1 min, 40% ~ 30%A; 1 ~ 4.3 min, 30% ~ 5%A), 流速 0.3 ml/min, 柱温 40 ℃。以利血平为检测内标, 采用多反应监测模式同时测定香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、6-姜酚、桔皮素、羌活醇、川陈皮素、紫花前胡苷、橙皮苷 11 个化学主成分的含量。**结果**　寒湿郁肺汤中 11 个主成分在各自浓度范围内线性关系良好（r>0.98）, 平均回收率在 93.11% ~ 111.73%。**结论**　该实验所建立的方法操作简便、重复性好, 为寒湿郁肺汤的质量控制提供了实验室依据。

［关键词］ 超高效液相色谱串联质谱法; 含量测定; 新型冠状病毒肺炎; 寒湿郁肺汤
［中图分类号］ R917　　［文献标志码］ A　　［文章编号］ 1006-0111（2021）02-0148-04
［DOI］ 10.12206/j.issn.1006-0111.202012017

Determination of 11 main components in Hanshi Yufei decoction, a COVID-19 empirical prescription by UHPLC-MS/MS

CUI Lili[1,2], CHEN Yong[1], ZHANG Mengwei[1,2], YAN Hongxia[1,3], GAO Shouhong[1], CHEN Wansheng[1]（1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Navel Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Yichun University, Yichun 336000, China; 3. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650000, China）

［**Abstract**］ **Objective**　To establish a method to determine 11 main components in Hanshi yufei decoction. **Methods**　The method adopted UHPLC-MS/MS with an Agilent ZORBAX SB-C_{18} (3.5 μm, 2.1 mm×150 mm) column. The mobile phase was consisted of 0.2% formic acid plus 10 mmol/L ammonium acetate aqueous solution(A) - acetonitrile(B) and gradient elution (0–0.6 min, 80%–40%A; 0.6–1 min, 40%–30%A; 1–4.3 min, 30%–5%A) at 0.3 ml/min. The column temperature was 40 ℃ and 11 main components including vanillic acid, magnolol, honokiol, wogonin, sophorin, 6-gingerol, citrinin, qianghuo alcohol, nobiletin, nodakenin, and hesperidin were quantified in a multiple reaction monitoring mode. The reserpine was the standard. **Results**　The 11 main components in Hanshi Yufei decoction had a good linear relationship within their concentration range (r>0.98), and the average recovery was 93.11% ~ 111.73%. **Conclusion**　The UHPLC-MS/MS method established in this experiment is easy to operate and has good reproducibility, which provides a laboratory basis for the quality control of Hanshi Yufei decoction.

［**Key words**］ UHPLC-MS/MS; content determination; COVID-19; Hanshi Yufei decoction

新型冠状病毒肺炎（简称新冠肺炎, COVID-19）, 具有较强的人际传播能力, 传播速度快[1-3]。COVID-19 患者会出现与流感类似的症状, 包括发烧、咳嗽、乏力、腹泻等, 重症患者出现呼吸困难或低氧血症, 可发展为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、多器官功能衰竭等导致死亡[4]。中医药早期干预可有效预防病情向重、危重方向恶化[5]。目前, 中医药控制 COVID-19 的疗效普遍受到重视[6], 业界提倡结合不同疾病阶段使用不同的处方[2]。寒湿郁肺汤为武汉火神山医院依据国家卫健委印发的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》所引进的四种肺炎诊疗中药汤剂处方之一, 用于新型冠状病毒初期治疗, 该汤剂由苍术、陈皮、厚朴、藿香、草果、生麻黄、羌活、生姜共八味中药组方而成。

UHPLC-MS/MS 因具有分离能力强, 检测限低, 高灵敏度, 高选择性等特点, 易于开发为临床检测项目的参考方法[7]。本研究应用 UHPLC-MS/MS 法, 依照 2015 版中国药典对寒湿郁肺汤中 11 种主

［基金项目］ 上海市临床药学重点专科建设项目（2016-40044-002）; 上海市卫生计生系统重要薄弱学科建设项目（2016ZB0303）
［作者简介］ 崔莉莉, 硕士生, 研究方向: 药物分析与临床药学, Email: CuiLiLi1993@126.com
［通信作者］ 高守红, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药物分析与临床药学, Email: gaoshouhong@smmu.edu.cn

成分进行含量测定，为后续的质量研究奠定基础。

1　材料

1.1　仪器

Agilent1290 超高效液相色谱仪（包括 G4220A 二元高压泵、G4226A 自动进样器、G1330B 控温箱、G1316C 柱温箱）、Agilent G6460A 型三重四极杆串联质谱仪、电喷雾离子源、Mass Hunter 化学工作站 B.06.00（美国 Agilent 公司）；BSA124S-CW 型天平、CPA225D 型天平（德国 Sartorius 公司）；Mini spin 型离心机、移液枪（德国 Eppendorf 公司）；Labnet VX-200 型定时可调速涡旋混合器（美国 Labnet 公司）；SK7200H 型超声仪（上海科导超声仪器有限公司）；UNIVERSAL32R 型台式冷冻离心机（德国 Hettich 公司）。

1.2　试剂和药品

香草酸（批号：H11J9Z65318）、厚朴酚（批号：Y27J10C91584）、和厚朴酚（批号：T28O6B5149）、汉黄芩素（批号：T11J11R108209）、刺槐素（批号：C12O8Q45551）、6-姜酚（批号：P29O10F101611）、桔皮素（批号：H24F11K108893）、羌活醇（批号：R28M9F57295）、川陈皮素（批号：N10J10R90249）、紫花前胡苷（批号：W07A10Z94862）、利血平（批号：Y02M11Y17235）、橙皮苷（批号：P06D9F77001）均为对照品，纯度均≥97%，购于上海源叶生物科技有限公司；甲醇（批号：10951907818，质谱级）、乙腈（批号：JA075930，质谱级）购自德国默克公司；甲酸（批号：17033D，分析纯）、乙酸铵（批号：H1709024，色谱纯）购自阿拉丁试剂（上海）有限公司；水为屈臣氏蒸馏水（广州屈臣氏食品饮料有限公司），其余试剂均为分析纯。

1.3　样品

寒湿郁肺汤中苍术（批号：20092108）、陈皮（批号：20010181）、厚朴（批号：20061903）、藿香（批号：20031708）、草果（批号：19092902）、生麻黄（批号：20200301）、羌活（批号：20070709）等中药材均由上海长征医院药材科提供，生姜（批号：19062404）购于广西壮族自治区。

2　方法与结果

2.1　溶液的制备

2.1.1　对照品溶液

分别取各对照品适量，精密称定，用甲醇配制成含 1.01 mg/ml 香草酸、0.99 mg/ml 厚朴酚、1.03 mg/ml 和厚朴酚、1.00 mg/ml 汉黄芩素、1.00 mg/ml 刺槐素、1.01 mg/ml 6-姜酚、1.02 mg/ml 桔皮素、1.01 mg/ml 羌活醇、1.03 mg/ml 川陈皮素、1.00 mg/ml 紫花前胡苷、1.00 mg/ml 利血平（IS）和 1.00 mg/ml 橙皮苷的对照品溶液，于−20 ℃ 冰箱保存，备用。

2.1.2　供试品溶液

取寒湿郁肺汤中苍术 15 g、陈皮 10 g、厚朴 10 g、藿香 10 g、草果 6 g、生麻黄 6 g、羌活 10 g、生姜 10 g，精密称定，置锅中，加水 500 ml，浸泡 30 min，加热至煮沸后调至文火煎 20 min，取药液；第二次加水 300 ml，加热至煮沸后调至文火煎 20 min，取药液，与第一次药液混匀，取出，放冷。精密量取药液 1 ml，加入 1 μg/ml 的利血平 10 μl，涡旋 3 min，14 500 r/min 离心 10 min，取上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，续滤液即为供试品溶液。

2.2　色谱与质谱条件

2.2.1　色谱条件

AgilentZORBAXSB-C_{18} 色谱柱（3.5 μm，2.1 mm×150 mm），流动相为 0.2% 甲酸水−10 mmol/L 醋酸铵溶液（A）-乙腈（B）；梯度洗脱：0 ~ 0.6 min，80% ~ 40% A；0.6 ~ 1 min，40% ~ 30% A；1 ~ 4.3 min，30% ~ 5% A；流速：0.3 ml/min；柱温：40 ℃；进样量：10 μl，每个样品的分析周期为 4.3 min。

2.2.2　质谱条件

采用电喷雾离子源（ESI）和多反应监测模式（MRM）。正负离子同时扫描；氮气作为雾化气和干燥气；高纯氮气为碰撞气，毛细管电压为 4 000 V；碰撞气压为 40 psi；鞘流气温为 350 ℃，干燥气温为 325 ℃，干燥气流速为 12 L/min；将一定浓度的标准溶液和内标溶液进样，在 ESI 电离方式下进行产物离子全扫描分析（见图 1），定量分析质荷比详见表 1。

2.3　方法学考察

2.3.1　专属性考察

分别精密吸取空白溶剂、对照品溶液和供试品溶液各 10 μl，按“2.1.2”项下方法制样，再按照“2.2”项下色谱与质谱条件进样测定，记录图谱。结果显示，专属性符合相关要求（图 2）。

2.3.2　线性关系的考察

精密量取对照品溶液适量，浓度稀释为如下的混合对照品溶液：香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、桔皮素、羌活醇、紫花前胡苷的线性浓度为 20、50、100、200、500、1 000、1 500、2 000 ng/ml；6-姜酚、川陈皮素、橙皮苷的线性浓度为 200、500、1 000、2 000、5 000、10 000、15 000、20 000 ng/ml。采用内标定量法按“2.2”项下色谱与

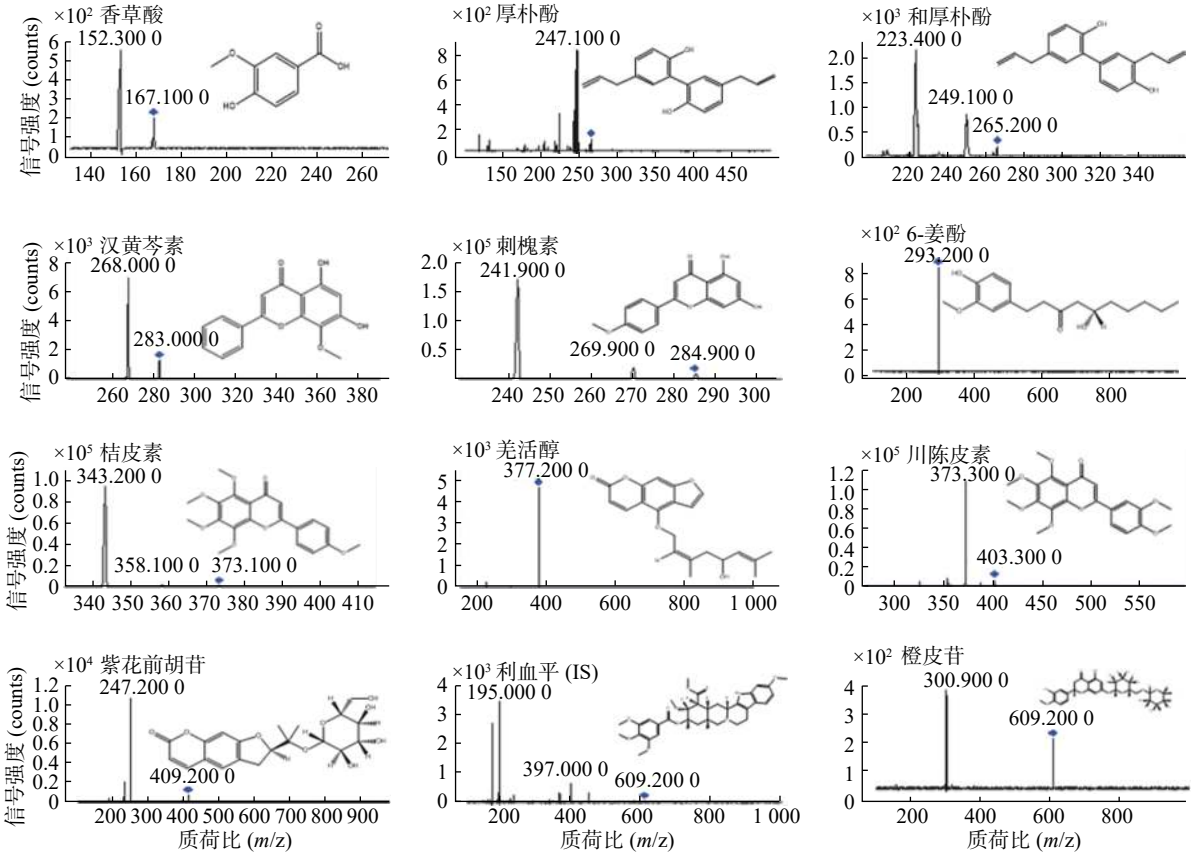

图 1　寒湿郁肺汤中 11 个主成分及内标的二级产物离子图

表 1　寒湿郁肺汤中 11 个主成分及内标的质谱检测参数

测定成分	母离子（*m/z*）	子离子（*m/z*）	裂解电压 (V)	碰撞能量 (V)	ESI 模式
香草酸	167.1	152.3	70	10	−
厚朴酚	265.1	247	148	29	−
和厚朴酚	265.2	223.4	135	29	−
汉黄芩素	283.1	268.1	105	13	−
刺槐素	284.9	241.9	140	34	−
6-姜酚	293.2	293.2	130	0	−
桔皮素	373.1	343.2	135	28	+
羌活醇	377.3	377.3	130	0	+
川陈皮素	403.3	373.3	130	26	+
紫花前胡苷	409.2	247.2	95	11	+
利血平(IS)	609.2	195	240	35	−
橙皮苷	609.2	300.9	135	15	−

质谱条件进行测定，并记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标（*Y*），对照品质量浓度为横坐标（*C*），绘制标准曲线，并进行线性回归，结果见表 2。

2.3.3　精密度试验

将母液稀释 10 倍，按“2.2”项下色谱与质谱条件进行测定，连续进样 6 次，记录峰面积，计算 RSD。结果显示，香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、6-姜酚、桔皮素、羌活醇、川陈皮素、紫花前胡苷、橙皮苷 11 种成分的峰面积 RSD 分别为 1.83%、5.57%、4.39%、3.14%、4.25%、4.01%、1.26%、1.40%、1.75%、3.29%、2.55%，表明该方法精密度良好。

2.3.4　重复性试验

取同一份寒湿郁肺汤供试品溶液，按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份，按“2.2”项下色谱与质谱条件进行测定，记录峰面积，计算 RSD。结果显示，香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、6-姜酚、桔皮素、羌活醇、川陈皮素、紫花前胡苷、橙皮苷 11 种化学成分的峰面积 RSD 分别为 4.78%、8.40%、5.55%、3.27%、1.51%、3.30%、1.30%、3.37%、1.21%、1.98%、2.46%，表明该方法重复性良好。

2.3.5　稳定性试验

取同一份供试品溶液，按“2.1.2”项下方法制备，室温放置，按“2.2”项下色谱与质谱条件，分别于 0、2、4、6、12、16、24 h 进样测定，记录峰面积，计算 RSD。结果显示，香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、6-姜酚、桔皮素、羌活醇、川陈皮素、紫花前胡苷、橙皮苷 11 种化学成分在 4 h 内的峰面积 RSD 分别为 5.81%、4.68%、3.17%、13.09%、13.20%、8.99%、6.19%、5.19%、4.18%、5.55%、

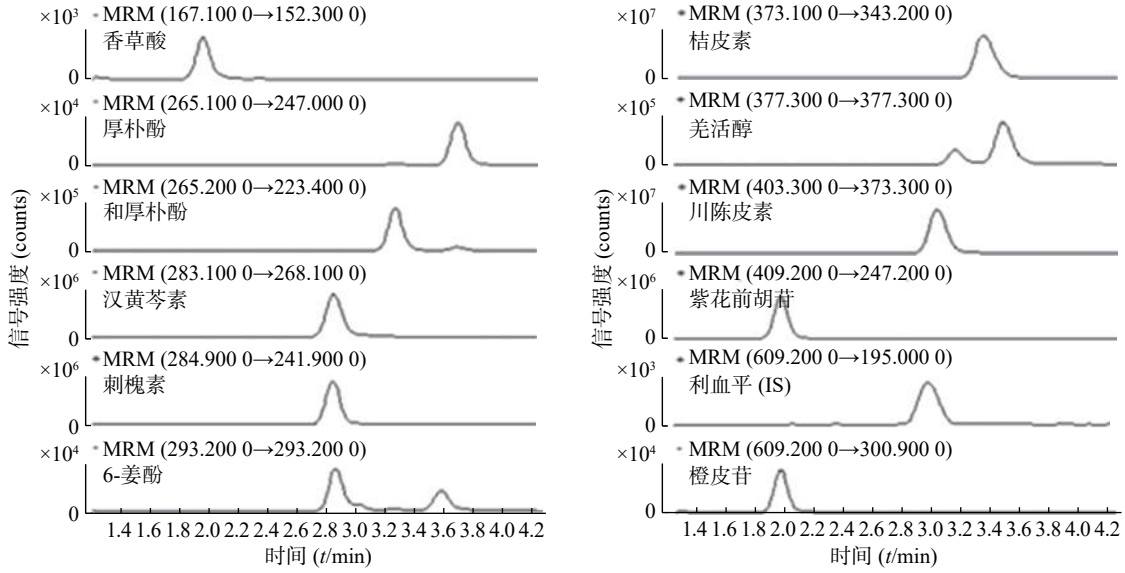

图 2　寒湿郁肺汤中 11 个主成分及内标的 MRM 色谱图

表 2　寒湿郁肺汤中 11 种成分的线性考察

测定成分	回归方程	r	线性范围(μg/ml)
香草酸	Y=9.023C-1.345	0.99	0.02~2.00
厚朴酚	Y=0.023C+0.002	0.99	0.02~2.00
和厚朴酚	Y=0.028C-0.060	0.98	0.02~2.00
汉黄芩素	Y=0.701C+1.802	0.98	0.02~2.00
刺槐素	Y=0.488C+0.205	0.99	0.02~2.00
6-姜酚	Y=0.003C+1.510	0.99	0.20~20.00
桔皮素	Y=4.291C+70.573	0.99	0.02~2.00
羌活醇	Y=0.173C+3.849	0.98	0.02~2.00
川陈皮素	Y=0.576C+277.012	0.99	0.20~20.00
紫花前胡苷	Y=0.362C-0.081	0.99	0.02~2.00
橙皮苷	Y=0.011C+0.061	0.99	0.20~20.00

9.47%, 表明供试品溶液在室温放置 4 h 内稳定性良好。

2.3.6　加样回收率试验

精密称取已知含量的寒湿郁肺汤样品, 加入各对照品适量, 平行制备 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱与质谱条件进样测定, 进行 UHPLC-MS/MS 分析, 计算各待测物的平均回收率及其 RSD。11 种待测物: 香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、6-姜酚、桔皮素、羌活醇、川陈皮素、紫花前胡苷、橙皮苷的平均加样回收率分别为 111.73%、102.96%、108.94%、102.90%、99.36%、104.83%、100.55%、100.27%、105.49%、96.92%、93.11%, RSD 分别为 2.44%、2.37%、4.44%、1.92%、4.60%、2.57%、1.79%、2.36%、4.99%、3.08%、3.59%, 表明该方法的准确度良好。

2.3.7　样品含量测定

取 9 批寒湿郁肺汤药材, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱与质谱条件进行测定, 计算寒湿郁肺汤 9 批样本中 11 种成分: 香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、6-姜酚、桔皮素、羌活醇、川陈皮素、紫花前胡苷、橙皮苷的含量, 测定结果为香草酸 0.07 ~ 0.09 μg/ml、厚朴酚 0.06 ~ 0.07 μg/ml、和厚朴酚 0.26 ~ 0.57 μg/ml、汉黄芩素 0.07 ~ 0.09 μg/ml、刺槐素 0.27 ~ 0.29 μg/ml、6-姜酚 0.55 ~ 0.58 μg/ml、桔皮素 0.31 ~ 0.33 μg/ml、羌活醇 0.54 ~ 0.58 μg/ml、川陈皮素 3.78 ~ 3.81 μg/ml、紫花前胡苷 0.31 ~ 0.33 μg/ml、橙皮苷 1.58 ~ 1.61 μg/ml。

3　讨论

3.1　色谱柱的选择

在预实验中分别考察了 Agilent ZORBAX SB C_{18}(3.5 μm, 2.1 mm ×100 mm)、Agilent ZORBAX SB-C_{18}(3.5 μm, 2.1 mm×150 mm)、Waters Xbridge® HILIC(3.5 μm, 2.1 mm×100 mm)、Waters Atlantis® T3(3 μm, 2.1 mm×100 mm)、Agilent Eclipse XDB-C_{18}(3.5 μm, 2.1 mm×150 mm)等色谱柱对 11 个待测成分含量测定的影响, 结果显示, 当色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C_{18}(3.5 μm, 2.1mm×150 mm)时, 11 个待测成分及内标的峰形最佳。

3.2　流动相的优化

实验中分别考察了水-乙腈、0.1% 甲酸水-乙腈、0.15% 甲酸水-乙腈、0.2% 甲酸水-乙腈、5 mmol/L 醋酸铵溶液-乙腈、10 mmol/L 醋酸铵水-乙腈、0.2% 甲酸-10 mmol/L 醋酸铵水溶液-甲醇、

(下转第 156 页)

1263-1266.
[2] AMRUTIYA N, MADAN M, BAJAJ A. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of prednicarbate, mupirocin and ketoconazole in topical dosage forms[J]. J Anal Chem, 2010, 65(11): 1148-1154.
[3] 王爱平, 李若瑜. 2%酮康唑乳膏在皮肤科疾病中的应用[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(3): 179-183.
[4] 陆雪华, 陆艳萍, 覃美玲, 等. 复方酮康唑莫匹罗星联合治疗真菌性皮肤溃疡疗效观察[J]. 基层医学论坛, 2018, 22(2): 158-160.
[5] 中国中西医结合学会皮肤性病学分会环境与职业性皮肤病学组. 糠酸莫米松乳膏临床应用专家共识[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2017, 16(1): 88-90.
[6] 孟甄, 金建玲, 刘玉庆, 等. 细菌耐药性的诱导与消除[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(9): 1047-1051.
[7] 谢阳, 万苗坚. 皮肤科常用糖皮质激素类药物的类型及适应证[J]. 中国医学文摘(皮肤科学), 2015, 32(3): 283-288.
[8] 刘淮, 刘景桢. 外用糖皮质激素的适应症与副作用[J]. 皮肤病与性病, 2016, 38(1): 19-20.
[9] 李文仕. RP-HPLC法测定复方中风康复片中盐酸麻黄碱的含量[J]. 中国药事, 2012, 26(5): 494-496.
[10] 颜苗, 张金娇, 李焕德, 等. RP-HPLC法同时测定甘草酸制剂中18α-、18β-甘草酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(2): 301-304, 309.
[11] ABDELWAHAB N S, ALI N W, ABDELKAWY M, et al. Validated RP-HPLC and TLC-densitometric methods for analysis of ternary mixture of cetylpyridinium chloride, chlorocresol and lidocaine in oral antiseptic formulation[J]. J Chromatogr Sci, 2016, 54(3): 318-325.
[12] WAN F Y, LI A H. Determination of three constituents in compound ketoconazole liniment by RP-HPLC[J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(7): 1263-1266.
[13] SHEHNAZ H, HAIDER A, SAEED ARAYNE M, et al. Carboxyterfenadine antacid interaction monitoring by UV spectrophotometry and RP-HPLC techniques[J]. Arab J Chem, 2014, 7(5): 839-845.
[14] VENISHETTY V K, PARIKH N, SISTLA R, et al. Application of validated RP-HPLC method for simultaneous determination of docetaxel and ketoconazole in solid lipid nanoparticles[J]. J Chromatogr Sci, 2011, 49(2): 136-141.
[15] AHMMED S M, MUKHERJEE P K, BAHADUR S, et al. CYP450 mediated inhibition potential of *Swertia chirata*: an herb from Indian traditional medicine[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 178: 34-39.
[16] STAUB I, FLORES L, GOSMANN G, et al. Photostability studies of ketoconazole: isolation and structural elucidation of the main photodegradation products[J]. Lat Am J Pharm, 2010, 29(7): 1100-1106.

［收稿日期］ 2020-06-20　［修回日期］ 2021-03-13
［本文编辑］ 陈盛新

(上接第 151 页)

0.2% 甲酸-10 mmol/L 醋酸铵水溶液-乙腈等流动相对 11 个成分含量测定的影响，结果显示，此 11 个待测成分在 0.2% 甲酸-10 mmol/L 醋酸铵水溶液-乙腈中，采用梯度洗脱，响应与峰形均佳。

3.3　内标与化学成分的选择

在预实验中分别考察了培美曲塞、利血平、卡马西平三个标准品作为内标时的响应和出峰时间，最终选用了出峰时间居中、响应好、稳定性高的利血平作为内标。本实验中所选取的化学成分以药典为基础，结合文献调研，舍弃挥发油类成分及违禁成分，最终选取了 11 个能代表药材的化学成分进行研究。

4　结语

本研究基于 UHPLC-MS/MS 同时测定寒湿郁肺汤中 11 个成分含量的方法，经色谱柱、流动相的优化和全面的方法学考察，成功应用于样品中寒湿郁肺汤 11 种成分的测定。该法简便可靠，可为寒湿郁肺汤中的成分检测提供一定的方法参考，也为寒湿郁肺汤的质量控制及质量标准研究奠定了基础。

【参考文献】

[1] LUO H, TANG Q L, SHANG Y X, et al. Can Chinese medicine be used for prevention of *Corona* virus disease 2019 (COVID-19)? A review of historical classics, research evidence and current prevention programs[J]. Chin J Integr Med, 2020, 26(4): 243-250.
[2] LI Y X, LIU X B, GUO L X, et al. Traditional Chinese herbal medicine for treating novel coronavirus (COVID-19) pneumonia: protocol for a systematic review and meta-analysis[J]. Syst Rev, 2020, 9(1): 75.
[3] ZHU F C, LI Y H, GUAN X H, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial[J]. Lancet, 2020, 395(10240): 1845-1854.
[4] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)[EB/OL]. [2020-12-01]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-03/04/content_5486705.htm
[5] REN J L, ZHANG A H, WANG X J. Traditional Chinese medicine for COVID-19 treatment[J]. Pharmacol Res, 2020, 155: 104743.
[6] YANG Y, ISLAM M S, WANG J, et al. Traditional Chinese medicine in the treatment of patients infected with 2019-new coronavirus (SARS-CoV-2): a review and perspective[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(10): 1708-1717.
[7] 中华医学会检验医学分会, 卫生计生委临床检验中心. 液相色谱-质谱临床应用建议[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(10): 770-779.

［收稿日期］ 2020-12-05　［修回日期］ 2021-03-13
［本文编辑］ 陈盛新