

香橘乳癖宁胶囊 UPLC 特征指纹图谱研究

李响^{1,2,3}, 白雪^{2,3}, 何毅^{2,3}, 吕燕男^{2,3}, 缪兴龙^{2,3}, 周桂荣^{2,3*}, 李萍^{1*}

1. 中国药科大学 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009

2. 天士力控股集团有限公司研究院, 现代中药开发中心, 天津 300410

3. 天士力医药集团股份有限公司创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410

摘要: 目的 建立香橘乳癖宁胶囊(XRC)的 UPLC 指纹图谱, 利用系统指纹定量法鉴定各批次制剂质量, 并采用电喷雾离子源-四极杆-飞行时间质谱(ESI-Q-TOF/MS^E)对其化学成分进行定性分析。方法 采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以 0.1%甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 0.25 mL/min, 柱温为 28 ℃, 检测波长为 270 nm。以系统指纹定量法的宏定性相似度(S_m)、宏定量相似度(P_m)为评价指标, 对 10 批制剂的整体质量进行评价。并利用 UPLC-ESI-Q-TOF/MS^E 正、负 2 种离子模式扫描对共有峰成分进行定性分析。结果 建立 10 批 XRC 的 UPLC 对照指纹图谱, 标定 33 个共有峰, 指认其中 28 个成分, 并分别归属药材来源。系统指纹定量法评价结果表明, 9 批制剂质量在 5 级以上。结论 建立有效、可靠的 XRC 制剂质量评价方法, 对其质量控制方法进行提升, 并为物质基础的进一步研究奠定基础。

关键词: 香橘乳癖宁胶囊; 电喷雾离子源-四极杆-飞行时间质谱; 系统指纹定量法; 指纹图谱; 丹酚酸 B

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)02-0346-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.013

UPLC characteristic chromatographic profile of Xiangju Rupining Capsule

LI Xiang^{1,2,3}, BAI Xue^{2,3}, HE Yi^{2,3}, LV Yan-nan^{2,3}, MIAO Xing-long^{2,3}, ZHOU Gui-rong^{2,3}, LI Ping¹

1. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. TCM Research Center, Tasly Academy, Tasly Holding Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To establish fingerprint analysis method by UPLC for quality control of Xiangju Rupining Capsule (XRC), and assess the quality of each sample by systematic quantified fingerprint method, then to identify the compositions by ESI-Q-TOF/MS^E.

Methods The Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid in gradient elution. The flow rate was 0.25 mL/min. The column temperature was 28 ℃, and detection wavelength was 270 nm. Macro qualitative similarities (S_m) and macro quantitative similarities (P_m) were used as the assessing parameters to evaluate the overall quality of 10 batches of XRC. Ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF/MS^E) was used for qualitative analysis of common components in the positive and negative ion modes. **Results** Fingerprints of 10 batches of XRC were established and 33 common peaks were obtained, then 28 of which were identified, belonging to six medicinal herbs. The results of systematic quantified fingerprint method showed that quality of nine batches samples was above grade 5. **Conclusion** The effective and reliable quality evaluation method of XRC was established, which is beneficial to the study of its material basis.

Key words: Xiangju Rupining Capsule; UPLC-ESI-Q-TOF/MS^E; systematic quantified fingerprint method; fingerprint; salvianolic acid B

收稿日期: 2017-08-15

基金项目: 国家重大科技专项重大新药创制——中医药优势领域的创新中药关键技术开发研究(2017ZX09301005)

作者简介: 李响(1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药分析与质量标准。E-mail: xiangxingye1993@163.com

*通信作者 李萍, 女, 教授。E-mail: liping2004@126.com

周桂荣, 女, 高级工程师。E-mail: zhougr@tasly.com

香橘乳癖宁胶囊(Xiangju Rupining Capsule, XRC)其处方由醋香附、夏枯草、橘叶、延胡索等 7 味药组成,具有理气疏肝、活血散结、调经止痛的作用,适用于肝郁气滞、痰凝血瘀所致的乳腺增生症。目前,其质量的控制方法主要是对其中 5 味药材进行薄层鉴别,并对橘叶和延胡索中的单一成分进行含量测定。为了更好地控制产品的质量,对各批次制剂质量一致性进行评价,保证临床疗效,需建立能够全面评价该制剂质量的方法。

中药指纹图谱利用其“整体性”和“模糊性”的特点,全面反映中药化学成分相对关系,对其质量进行整体评价。而基于“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 4.0”软件所建立的数字化指纹图谱,适应中药多组分的特点,利用多信息,从多角度实现对中药质量控制的提升^[1-3]。UPLC 结合 ESI-Q-TOF/MS^E 技术具有同时、高效、快速定性定量分析的特点,在中药复方多类多成分物质基础研究中应用广泛^[1]。本研究采用 UPLC 法建立了 XRC 数字化指纹图谱,采用系统指纹定量法客观地评价各批次 XRC 质量,实现对该制剂质量的整体控制以及差异性评价^[4-5],并利用 UPLC-Q-TOF-MS^E 对其化学成分进行初步鉴定,为 XRC 物质基础的研究奠定基础。

1 仪器与材料

Acquity UPLC,美国 Waters 公司,包括二元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器、Empower 3 色谱工作站;Acquity UPLC-Synapt G2 MS 色谱质谱联用仪,美国 Waters 公司;Mettler Toledo Xs205 分析天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;KQ-500DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;Milli-Q 超纯水系统,Millipore 公司。甲醇(色谱纯)、乙腈(质谱纯),美国 Merck 公司;甲酸(色谱纯),阿拉丁公司。对照品丹酚酸 B(质量分数 97.9%,批号 200619)、原儿茶醛(质量分数 98.2%,批号 201007)、丹参素钠(质量分数 98.1%,批号 201311)、隐丹参酮(质量分数 98.7%,批号 200806)、橙皮苷(质量分数 95.3%,批号 201316)、延胡索乙素(质量分数 99.9%,批号 201414)、丹参酮 II_A(质量分数 98.9%,批号 201520)、迷迭香酸(质量分数 99.8%,批号 201102)、丹参酮 I(批号 200406)、金丝桃苷(质量分数 94.3%,批号 201507)、槲皮苷(批号 200504)、麦芽酚(质量分数 99.6%,批号 201501),中国食品药品检定

研究院。10 批 XRC 制剂,天津天士力制药股份有限公司,规格:0.45 g/粒,批号 201611002、20150601、2015B01、2015B02、2015B03、2015B04、2015B05、20170101、20140701、20131002,分别编号 S1~S10。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈;梯度洗脱(0~3.0 min, 5%乙腈;3.0~5.0 min, 5%~10%乙腈;5.0~9.0 min, 10%~15%乙腈;9.0~14.0 min, 15%~20%乙腈;14.0~20.0 min, 20%~22%乙腈;20.0~27.0 min, 22%~43%乙腈;27.0~30.0 min, 43%~57%乙腈;30.0~34.0 min, 57%~65%乙腈;34.0~36.0 min, 65%~100%乙腈;36.0~38.0 min, 100%~5%乙腈;体积流量 0.25 mL/min;紫外检测波长 270 nm;柱温 28 °C;进样量 1 μL;洗脱 38 min。理论塔板数以丹酚酸 B 峰计不小于 15 000。

2.1.2 质谱条件 离子源:电喷雾电离离子源(ESI);检测方法:正负离子分别检测;毛细管电压:3.0 kV (positive), -2.5 kV (negative);锥孔电压:40 V;提取锥孔电压:5.0(kV);离子源温度:100 °C;脱溶剂气温度:300 °C;锥孔气(N₂)体积流量:50 L/h;脱溶剂气(N₂)体积流量:800 L/h;质量扫描范围:*m/z* 100~1 200;碰撞气:氩气(Ar);碰撞能:20~40 eV。

2.2 对照品溶液制备

精密称取丹酚酸 B 对照品 5 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀得 500 μg/mL 对照品储备液,同法分别配制 500 μg/mL 原儿茶醛、丹参素钠、隐丹参酮、橙皮苷、延胡索乙素、丹参酮 II_A、迷迭香酸、丹参酮 I、金丝桃苷、槲皮苷、麦芽酚对照品储备液。进样前用甲醇分别稀释至 10 μg/mL。

2.3 供试品溶液制备

取 XRC 内容物 1.0 g,精密称定,加 70%甲醇 50 mL,超声提取 20 min,摇匀,冷却至室温,14 100 r/min 离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得供试品溶液。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液(批号 201611002)1 μL,连续进样 6 次,记录色谱图,将谱图积分的 AIA 文件导入“中药色谱指纹图谱超

信息特征数字化评价系统 4.0” 软件, 选取 8 强峰。以丹酚酸 B 的保留时间和峰面积为参照, 计算各波长下各共有峰相对保留时间 RSD 均 < 1.0%, 相对峰面积 RSD 均 < 3.0%, 表明检测系统进样精密合格。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液 (批号 201611002), 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 记录色谱图, 将谱图积分 AIA 文件导入“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 4.0” 软件, 选取 8 强峰。以丹酚酸 B 的保留时间和峰面积为参照, 计算各波长下各共有峰相对保留时间 RSD 均 < 1.0%, 相对峰面积 RSD 均 < 3.0%, 表明样品在室温下 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取样品 (批号 201611002) 平

行制备 6 份供试品溶液并进样检测, 记录色谱图, 将谱图积分的 AIA 文件导入“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 4.0” 软件, 选取 8 强峰。以丹酚酸 B 的保留时间和峰面积为参照, 计算各波长下各共有峰相对保留时间 RSD 均 < 1.0%, 相对峰面积 RSD 均 < 3.0%, 表明方法重复性良好。

2.5 对照指纹图谱的建立

将 10 批 XRC 供试品溶液分别进样检测, 记录 270 nm 波长下色谱图, 以丹酚酸 B 为参照峰, 按峰出现率 100% 计, 确定各检测波长下的共有指纹峰 33 个。将谱图积分的 AIA 文件导入“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 4.0” 软件, 按均值法生成 270 nm 波长下的对照指纹图谱 (RFP) 见图 1。

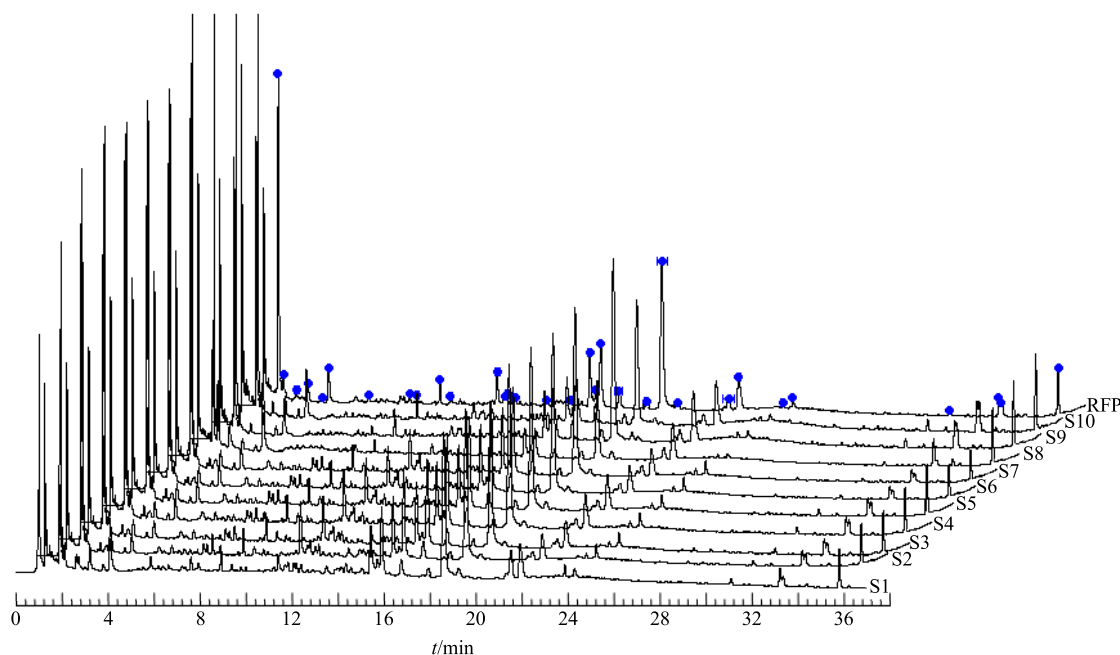


图 1 270 nm 波长下 10 批 XRC 和 RFP 的 UPLC 指纹图谱

Fig.1 UPLC fingerprints of 10 batches of XRC and RFP under 270 nm wavelengths

2.6 系统指纹定量法评价 XRC 质量

利用系统指纹定量法 (systematic quantified fingerprint method, SQFM) 从整体宏观定性角度和定量角度对中药进行全方位量化控制, 是中药整体质量控制的科学方法。其主要用宏定性相似度 (S_m) 见式 (1), 表征 XRC 指纹图谱化学指纹数量和含量分布比例与 RFP 的相似程度; 宏定量相似度 (P_m) 见式 (2), 表征 XRC 化学指纹整体含量与 RFP 的差异; 样品均化变异系数 (α) 见式 (3), 表征 XRC 指纹信息和对照指纹信息的均化程度即同态性。三者结合来鉴定中药质量, 并据此将中药质量划分为

8 级^[4] (I~VIII, 表 1), XRC 质量评价结果见表 2。公式 (1~3) 中, n 为指纹峰数, x_i 与 y_i 为各指纹峰积分面积, γ 为指纹信号均化系数^[4,6-7]。

$$S_m = (S_F + S_F')/2 = \left[\sum_{i=1}^n x_i y_i / \left(\sum_{i=1}^n x_i^2 \sum_{i=1}^n y_i^2 \right)^{1/2} + \sum_{i=1}^n (x_i / y_i) / \left(n \sum_{i=1}^n (x_i / y_i)^2 \right)^{1/2} \right] / 2 \quad (1)$$

$$P_m = (C + P')/2 = \left(\sum_{i=1}^n x_i y_i / \sum_{i=1}^n y_i^2 + S_F \sum_{i=1}^n x_i / \sum_{i=1}^n y_i \right) / 2 \quad (2)$$

$$\alpha = |1 - \gamma_x / \gamma_y| = |1 - P/C| \quad (3)$$

SF 为定性相似度, SF' 比率定性相似度, C 为投影含量相似度, P 定量相似度, P' 为中间变量

2.7 共有峰指认与药材归属

利用 UPLC-Q-TOF-MS^E 正、负离子 2 种模式分别对供试品溶液进行扫描, 结果见图 2。在对相关质谱数据进行数据分析和参照相关文献的基础上, 对 33 个共有峰成分进行鉴定, 并利用对照品进行部

表 1 系统指纹定量法评价中药质量等级标准

Table 1 Traditional Chinese medicine quality grades evaluated by SQFM

等级	S_m	$P_m/\%$	α	质量
I	0.95	95~105	0.05	极好
II	0.90	90~110	0.10	很好
III	0.85	80~120	0.15	好
IV	0.80	75~125	0.20	良好
V	0.70	70~130	0.30	中
VI	0.60	60~140	0.40	一般
VII	0.50	50~150	0.50	差
VIII	≤ 0.5	0~ ∞	≥ 0.50	劣

分确证。进一步对比相同液质条件下, 7 味药材和供试品溶液色谱峰及其质谱信息, 对已鉴定的 28 个化学成分进行药材归属。相关实验数据及结果见表 3。

表 2 系统指纹定量法评价 10 批 XRC 质量结果

Table 2 Quality of 10 batches of XRC evaluated by SQFM

样品	S_m	$P_m/\%$	α	等级	质量
RFP	1.000	100.0	0.000	I	极好
S1	0.954	89.8	0.059	III	好
S2	0.974	108.2	0.046	II	很好
S3	0.989	118.1	0.026	III	好
S4	0.990	115.6	0.024	III	好
S5	0.971	110.6	0.066	III	好
S6	0.974	112.7	0.075	III	好
S7	0.981	110.1	0.047	III	好
S8	0.752	50.8	0.137	VII	差
S9	0.911	79.4	0.040	IV	良好
S10	0.880	93.7	0.047	III	好

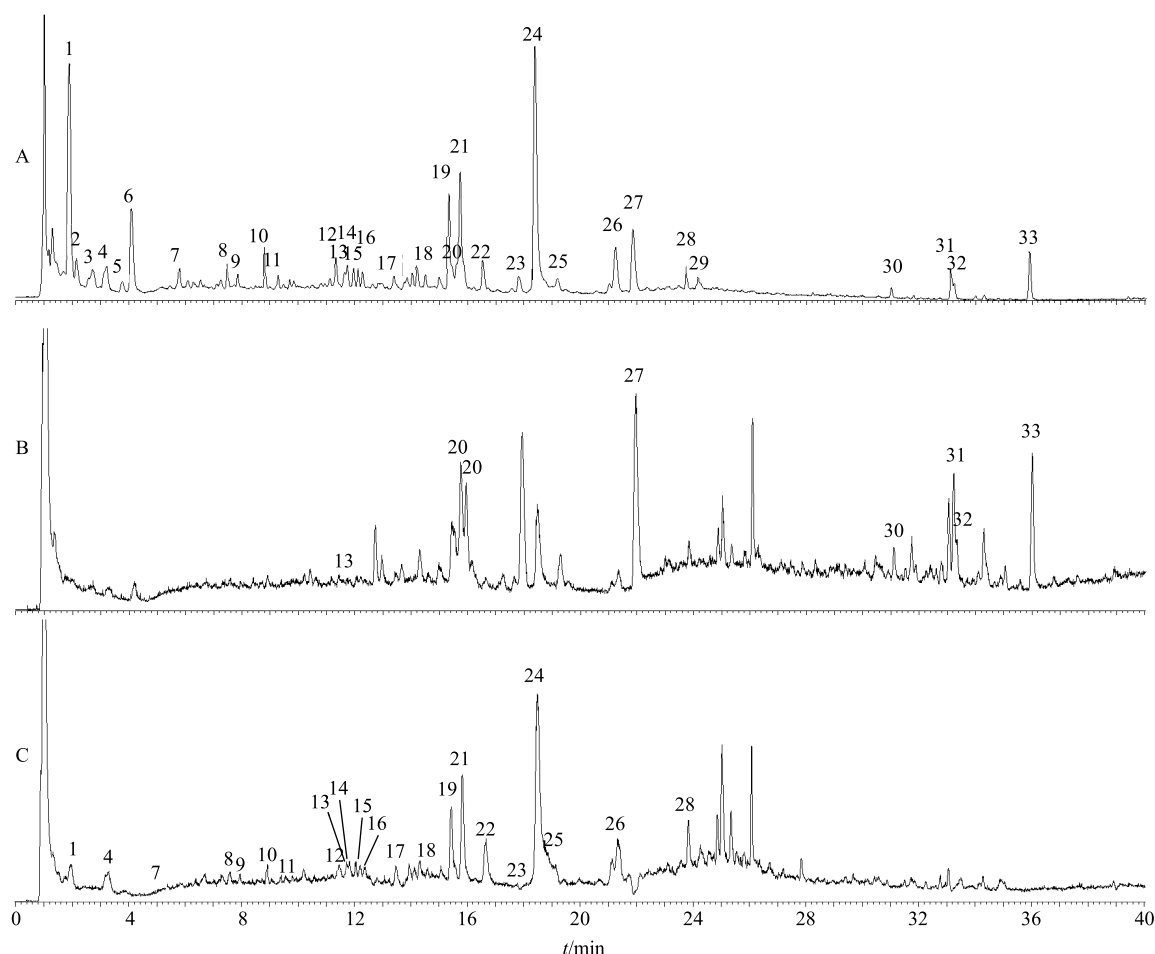


图 2 XRC 的 UPLC-UV 图 (A)、正离子模式总离子流图 (B) 和负离子模式总离子流图 (C)

Fig. 2 UPLC-UV (A) and ESI-MS total ion chromatogram in positive (B) and negative (C) mode of XRC

表 3 XRC 中化学成分 UPLC-Q-TOF/MS^E 数据及鉴定结果Table 3 Information of identified compounds in XRC by UPLC-Q-TOF/MS^E

峰号	t_R /min	测定值及模式	分子式	理论值	误差/($\times 10^{-6}$)	鉴定	MS ^E 碎片离子	药材归属	文献
1	1.892	169.013 8 [M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	169.013 7	0.59	没食子酸	125.025 1	月季花	8
2	2.102	433.126 8	—	—	—	—	—	—	—
3	2.573	310.126 3	—	—	—	—	—	—	—
4*	3.269	197.044 5 [M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.045 0	-2.54	丹参素钠	395.095 9, 179.034 0, 135.045 3, 151.040 8	丹参	9-11
5	3.547	376.160 1	—	—	—	—	—	—	—
6	4.160	127.040 1 [M+H] ⁺	C ₆ H ₆ O ₃	127.039 5	4.72	麦芽酚	180.962 4, 109.025 5, 305.995 1	土贝母	12
7*	5.860	137.024 1 [M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₃	137.023 9	1.46	原儿茶醛	136.029 6	夏枯草	11
8	7.551	179.033 6 [M-H] ⁻	C ₉ H ₆ O ₄	179.034 4	-4.47	咖啡酸	135.042 9	丹参	10,13
9	7.896	609.146 3 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.145 6	1.15	木犀草素-6,8-二-C-葡萄糖苷	519.110 6, 489.103 9, 429.109 6, 399.083 7, 369.076 1	橘叶	14
10	8.879	593.150 0 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.150 7	-1.18	芹菜素-6,8-二-C-葡萄糖苷	353.065 9, 297.086 0	橘叶	14
11	9.366	623.162 7 [M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623.161 2	2.41	金圣草黄素-6,8-二-C-葡萄糖苷	383.084 7, 503.125 6, 413.091 6	橘叶	14
12	11.414	563.140 7 [M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.140 0	1.24	芹菜素-6-C-葡萄糖-2''-O-木糖苷	413.083 2, 293.049 1	橘叶	14
13	11.566	342.171 1 [M] ⁺	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄	342.170 5	1.75	木兰花碱	311.115 4, 296.099 4, 281.109 1, 264.082 4, 236.073 2, 221.058 8, 192.102 8, 177.060 0	延胡索	15
14	11.667	563.139 6 [M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.140 0	-0.71	芹菜素-8-C-葡萄糖-2''-O-木糖苷	413.087 7, 293.045 5	橘叶	14
15*	12.027	463.086 8 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.087 7	-1.94	金丝桃苷或其异构体	300.027 2, 271.024 0, 255.026 4, 151.002 9	月季花	16-18
16	12.194	593.151 5 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.150 7	1.35	木犀草素-7-O-芸香糖苷	285.040 9	橘叶	14
17	13.447	521.127 4 [M-H] ⁻	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	521.129 5	-4.03	黄花鼠尾草苷	359.072 2, 179.038 3, 161.026 6	夏枯草	19
18	14.586	607.162 1 [M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	607.166 3	-6.92	香叶木苷	299.054 9, 284.041 7	橘叶	14
19*	15.417	609.179 0 [M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609.181 9	-4.76	橙皮苷	301.069 6, 286.046 1, 242.065 1, 151.013 8	橘叶	14
20	15.733	356.187 5 [M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.186 2	3.65	延胡索乙素	192.103 8, 165.090 0, 177.071 9, 150.637 1	延胡索	20
20*	15.753	320.093 4 [M] ⁺	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄	320.092 3	3.44	黄连碱	292.098 4, 277.079 8, 234.090 6, 262.089 3, 249.083 5	延胡索	20
21*	15.813	359.075 0 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.076 7	-4.73	迷迭香酸	179.032 1, 161.023 1, 133.029 3	丹参	13
20	15.919	356.187 1 [M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356.186 2	2.53	海罂粟碱	325.141 3, 310.122 7, 295.106 2, 294.126 4	延胡索	20
22	16.628	493.111 0 [M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	493.113 5	-5.07	丹酚酸 A	313.059 5, 295.058 3	丹参	21
23	17.904	370.203 5 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₇ NO ₄	370.201 8	4.59	紫堇碱	192.104 2, 165.092 5, 150.068 5	延胡索	20
24*	18.471	717.142 5 [M-H] ⁻	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	717.145 6	-4.32	丹酚酸 B	519.090 6, 321.038 6, 339.049 4, 293.044 6, 279.029 5, 295.059 2, 277.048 3	丹参	21
25	19.244	352.155 8 [M] ⁺	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄	352.154 9	2.56	巴马汀	337.130 2, 320.119 2, 308.129 9	延胡索	22
26	21.307	493.111 5 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	493.113 5	-4.06	丹酚酸 H	295.058 3, 159.040 2	丹参	10
27	21.916	366.171 3 [M] ⁺	C ₂₂ H ₂₄ NO ₄	366.170 5	2.18	脱氧紫堇碱	351.146 7, 350.140 2, 336.124 1, 334.133 6, 322.144 8, 308.128 8, 321.129 5	延胡索	23-25
28	23.827	565.133 5 [M-H] ⁻	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₂	565.134 6	-1.95	紫草酸乙酯	519.113 0, 367.079 2, 339.051 6, 321.039 2	丹参	13
29	24.336	715.126 8	—	—	—	—	—	—	—
30	31.071	279.103 5 [M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	279.102 1	5.02	二氢丹参酮 I	261.095 4, 233.098 3, 233.098 3, 215.084 8, 205.101 9, 109.081 3	丹参	13
31*	33.201	297.150 4 [M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	297.149 0	4.71	隐丹参酮	279.140 1, 251.141 9, 268.110 5, 237.104 9	丹参	26
		319.131 2 [M+Na] ⁺		319.131 1	0.31				
32*	33.316	277.087 5 [M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	277.086 5	3.61	丹参酮 I	249.092 8, 221.099 1, 193.103 3, 178.079 8	丹参	26
		299.069 2 [M+Na] ⁺		299.068 4	2.67				
33*	35.984	611.239 9 [2M+Na] ⁺	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	611.241 0	-1.80	丹参酮 II _A 或其异构体	280.111 2, 277.125 3, 262.101 4, 252.081 2, 249.125 4	丹参	27-28
		317.116 5 [M+Na] ⁺		317.115 4	3.47				
		295.134 7 [M+H] ⁺		295.133 4	4.40				

*经过对照品确证的成分

*is composition confirmed after reference substance

3 讨论

3.1 结合超信息特征数字化参数建立指纹图谱

利用“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 4.0”软件得到超信息特征数字化参数,以其中色谱指纹图谱指数(chromatographic fingerprints index, F)作为优化指标,表征不同条件下指纹图谱系统信号强弱、均化性和有效分离率大小,见式(4)。其中 F 值综合利用有效分离率(β)见式(5),表征色谱峰基线分离情况, $\beta=1$ 时表明所有峰基线分离;指纹信号响应强度(R)见式(6),表征指纹信号响应总强度,其值越大越好;指纹信号均化系数(γ)见式(7),表征指纹信号均化程度,其值越接近 1,指纹均化程度越好。因此, F 值越大越好^[29]。本研究结合图谱和 F 值对 XRC 特征指纹图谱条件进行筛选优化,建立有效合理的 XRC 特征指纹图谱。公式(4~7)中, m 为基线分离的峰对数($R \geq 1.5$), $n-1$ 为总峰对数, A_i 为以谷-谷积分获得的峰面积, A_0 为 n 个指纹峰的几何平均峰面积。

$$F = \lg R = n\beta\gamma \lg A_0 = \beta\gamma \sum_{i=1}^n A_i \quad (4)$$

$$\beta = m/(n-1) \quad (5)$$

$$R = \prod_{i=1}^n A_i = A_0^n [A_0 = n(\prod_{i=1}^n A_i)^{1/2}] \quad (6)$$

$$\gamma = \frac{\sum_{i=1}^n A_i / (n \sum_{i=1}^n A_i^2)}{[1/n \sum_{i=1}^n (A_i / \bar{A})^2]^{-1/2}} \quad (7)$$

3.1.1 色谱条件优化 本研究考察了不同检测波长、不同柱温、不同体积流量以及不同流动相的样品色谱图,计算并比较各条件下 F 值,并结合谱图分离情况确定色谱条件,具体条件见“2.1.1”项下。

采用 PDA 检测器对样品进行 190~400 nm 全波长扫描,提取吸收峰较多的 6 个波长(240、270、280、300、330、360 nm)下的色谱图进行 F 值计算比较,结果显示,270 nm 色谱图 F 值较大,并且符合图谱直观比较结果,能够较全面地反映 XRC 中的化学成分。因此,选择 270 nm 作为 XRC 指纹图谱的采集波长。综合考虑实验室和仪器的控温能力,选择柱温 35、30、28 °C 进行考察,利用所得色谱图计算 F 值。结果所示,28 °C 为最优温度,且图谱直观比较可见其分离度较好。实验中发现体积流量降低对指纹图谱各峰的分离效果有较好的改善,因此考察了体积流量 0.32、0.30、0.25 mL/min,结合 F 值和直观比较结果发现,0.25 mL/min 分离度较好,为较优体积流量。流动相的考察中,发现

复方中存在较多的酚酸类和黄酮类成分,酸性流动相可以进行较好地分离,并结合 F 值计算结果,确定乙腈-0.1%甲酸水作为流动相。

3.1.2 提取方法的优化 本实验考察了不同提取方式、不同提取时间以及不同提取溶剂下的样品色谱图,计算并比较各条件下 F 值,并结合谱图分离情况确定供试品溶液制备条件,具体条件见“2.3”项下。结果表明,超声和回流的效果相当,但超声操作简单便利,因此选择超声提取。超声时间选择了 20 和 60 min 进行比较,提取效果一致,依据节约便利的原则,选择超声时间为 20 min。考察提取溶剂的图谱和 F 值计算结果表明,70%甲醇提取效果好。因此,确定 70%甲醇为提取溶剂。

3.2 不同批次制剂质量分析

10 批 XRC 特征指纹图谱的 SQFM 数据显示, $S_1 \sim S_7$ 样品的 S_m 值均 ≥ 0.90 , P_m 均在 80%~120%, S_9 样品 P_m 偏低, S_{10} 样品 S_m 值偏低,但整体质量评级结果均在 5 级以上,质量较好; S_8 质量较差。结果表明,批次间存在一定差异性,初步分析原因主要源于药材质量和工艺过程控制,而其中 $S_1 \sim S_7$ 样品由于药材质量和工艺过程稳定可控,保证了制剂各批次间质量的一致性。

3.3 XRC 特征指纹图谱共有峰鉴定

在建立的 XRC 特征指纹图谱的基础上,结合色谱和质谱信息对 XRC 特征指纹图谱中的 33 个共有峰成分进行鉴定,共鉴定出 28 个共有峰,且 20 号色谱峰中鉴定出 3 种生物碱。目前已经鉴定共有峰成分包括了方中丹参、延胡索、橘叶、夏枯草、月季花 5 味药材的质控成分。而醋香附和土贝母 2 味药材的药典质控成分均未找到,推测可能是醋香附中主要为挥发性成分,不适宜液相-质谱分析;而土贝母中主要为皂苷类成分,其紫外响应低而在指纹图谱中易被忽略。因此需要进一步对实验进行改进和优化。

3.4 小结

本研究基于整体控制思维,建立了 XRC 数字化特征指纹图谱,对临床前研究的各批次制剂进行质量分析,总结各批次间差异性原因发现批次间质量受到药材质量、工艺过程等多因素的影响。因此,中药质量控制需从药材和制剂等各个层面上进行标准化研究,才能保证制剂质量的一致性和可控性。进一步对 XRC 特征指纹图谱的 33 个共有峰进行分析,鉴定其中 28 个并归属药材来源,初步明确了

XRC 的化学物质组成。但后期仍需要积累大量的制剂样本,为产品生产的质量评价提供数据支持,以及全面了解 XRC 的化学成分,为今后筛选药效成分以及建立化学组成明确和药效稳定的中药标准制剂奠定基础。

参考文献

- [1] 赵超,李会军,陈君,等. 中药复杂成分解析与质量评价的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(3): 283-288.
- [2] 孙国祥,智雪枝,张春玲,等. 中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 [J]. 中南药学, 2007, 5(6): 549-555.
- [3] 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.
- [4] 孙国祥,张玉静,孙万阳,等. 中药一致性评价关键问题——中药标准制剂控制模式和定量指纹图谱检查项 [J/OL]. 中南药学, 2016, 14(10): 1026-1032.
- [5] 杨方良,张晶,孙国祥,等. 中药组方指纹图谱研究方法和思路 [J]. 色谱, 2016, 34(7): 715-725.
- [6] 孙国祥,闫波,侯志飞,等. 中药色谱指纹图谱评价方法研究进展 [J]. 中南药学, 2015, 9(7): 673-681.
- [7] 孙国祥,高嘉悦,侯志飞,等. 用定量指纹图谱戈净度理论和统一化法评价复方丹参片高效液相色谱指纹图谱 [J]. 中南药学, 2015, 13(5): 449-454.
- [8] 汪丹,蔡甜,吴志军,等. HPLC-ESI-Q-TOF-MS 法分析金钱草颗粒的化学成分 [J]. 中国药房, 2016, 27(12): 1651-1654.
- [9] 祁晓霞,董宇,单晨啸,等. 基于 UFLC-Q-TOF/MS 分析黄芪-丹参药对化学成分研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(1): 93-96.
- [10] 赵洪芝,王静,姜民,等. 丹参总酚酸提取物 UPLC 指纹图谱及成分定性研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 620-622.
- [11] 章弘扬,胡坪,梁琼麟,等. 结合两种 LC/MS 方法用于复方丹参滴丸中多成分的鉴定 [J]. 中成药, 2009, 31(1): 60-64.
- [12] 张丽玲,李向高. 中国红参抗衰老成分分析——麦芽酚的分离鉴定与含量测定 [J]. 吉林农业大学学报, 1987, 9(4): 34-39.
- [13] Zhu Z, Zhang H, Zhao L, *et al.* Rapid separation and identification of phenolic and diterpenoid constituents from *Radix Salvia miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography diode-array detection, electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry and electrospray ionization [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2007, 21(12): 1855-1865.
- [14] 曹规划,付庆荣,张藏曼,等. HPLC-DAD-ESI-MSⁿ 技术对橘叶(福橘叶)中 96 个化学成分的快速分离和鉴定 (英文) [J/OL]. 中国药学: 英文版, 2016, 25(2): 91-110.
- [15] Ma C, Li Z, Wang L, *et al.* Identification of major alkaloids in rat urine by HPLC/DAD/ESI-MS/MS method following oral administration of *Cortex Phellodendri* decoction [J]. *Helv Chim Acta*, 2010, 92(2): 379-398.
- [16] 李芳,林丽美,李春. 夏枯草化学成分研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 270-273.
- [17] Zhou C, Liu Y, Su D, *et al.* A Sensitive LC-MS-MS method for simultaneous quantification of two structural isomers, hyperoside and isoquercitrin: Application to pharmacokinetic studies [J]. *Chromatographia*, 2011, 73(3/4): 353-359.
- [18] 王莎莎. 月季花中抗氧化性化学成分的分离与结构鉴定 [D]. 郑州: 郑州大学, 2010.
- [19] 梁杰康,张琳,严晓明. HPLC-ESI-MS/MS 鉴定夏枯草的主要化学成分 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2013, 11(14): 153-154.
- [20] Sun M, Liu J, Lin C, *et al.* Alkaloid profiling of the traditional Chinese medicine *Rhizoma corydalis* using high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2014, 4(3): 208-216.
- [21] 郑辛甜. 丹酚酸 B、丹酚酸 A 和黄芩苷的降解规律研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [22] 赵玲玲,袁将,王加利,等. HPLC-MS-*n* 法分析延胡索饮片中生物碱成分 [J]. 现代中药研究与实践, 2016, 30(3): 58-60.
- [23] 邵军,陈伟康,马双成,等. 夏天无提取物 UPLC 指纹图谱及成分定性研究 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(9): 1585-1589.
- [24] 韩彦琪,许浚,龚苏晓,等. 基于 HPLC-QTOF/MS 及 G 蛋白偶联受体分析的延胡索物质基础及作用机制研究 [J]. 药学报, 2016, 51(8): 1302-1308.
- [25] 杨岱琳,佟玲,李晓稳,等. UPLC-Q-TOF/MS-E 方法分析养血清脑颗粒的化学成分 [J]. 药学报, 2016, 51(5): 797-805.
- [26] Xie W, Zhang H, Zeng J, *et al.* Tissues-based chemical profiling and semi-quantitative analysis of bioactive components in the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge by using laser microdissection system combined with UPLC-q-TOF-MS [J]. *Chem Cent J*, 2016, 10(1): 42-55.
- [27] 韩凤梅,张玲,陈怀侠,等. 丹参脂溶性成分的 ESI-MS 行为及其特征图谱研究 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 122-125.
- [28] 沈建芳,汪红,王强,等. 丹参中丹参酮成分的 HPLC-MSⁿ 研究 [J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(10): 944-947.
- [29] 孙国祥,刘晓玲,邓湘昱,等. 色谱指纹图谱指数 F 和相对指数 Fr 的研究 [J]. 药学报, 2004, 39(11): 921-924.