

基于超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱技术的通脉颗粒质量评价研究

王志成¹, 季雪¹, 崔韶婧¹, 史琳^{2*}

1. 大连药品检验所, 辽宁 大连 116021

2. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110866

摘要: 目的 通过 UFLC-QTOF-MS 技术, 评价通脉颗粒的质量。方法 对 10 个生产企业的 61 批次的通脉颗粒, 采用 Agilent proshell 120 (100 mm×3.0 mm, 2.7 μm), 流动相是甲醇-缓冲盐, 梯度洗脱, 体积流量 0.4 mL/min, 柱温 40℃, ESI 源, 正离子模式下采集质谱数据。应用 Markerview 软件进行主成分分析 (PCA) 对通脉颗粒进行分组。结果 正离子模式时 PCA 分析能很好的区分通脉颗粒的质量, 通过 *t* 检验找出了大豆素 8-C-芹糖(1,6)-O-葡萄糖苷和 1,5-Anhydro-1-[5,7-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-8-yl]hexitol 两个差异最大的化合物。结论 PCA 分析可以作为评价通脉颗粒质量的分类方法。

关键词: UFLC-QTOF-MS; 通脉颗粒; 主成分分析

中图分类号: R917.4 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)04-0603-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.04.017

Quality evaluation of Tongmai Granule by UFLC-QTOF-MS

WANG Zhi-cheng¹, JI Xue¹, CUI Shao-jing¹, SHI Lin^{2*}

1. Dalian Institute for Drug Control, Dalian 116021, China

2. College of Food Science, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110866, China

Abstract: Objective To evaluate the quality of Tongmai Granule by UFLC-QTOF-MS. **Methods** The UFLC was performed on Agilent proshell 120 column (100 mm × 3.0 mm, 2.7 μm) with the mobile phase of MeOH- buffer salt (43:57) by gradient elution, the flow rate was 0.4 mL/min, the column temperature was 40 °C, electrospray ionization source was used under the positive ion mode. Tongmai Granule was classified by principle component analysis (PCA) with Markerview software. **Results** PCA analysis could distinguish the quality of Tongmai Granule under positive ion mode. Daidzein 8-C-apiosyl(1,6)-O-glucoside and 1,5-anhydro-1-[5,7-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-8-yl]hexitol were found to be the biggest different compounds by *t* test. **Conclusion** PCA is an effective classification method to evaluate the quality of Tongmai Granule.

Key words: UFLC-QTOF-MS; Tongmai Granule; PCA

通脉颗粒最早收载在《卫生部药品标准》中药成方制剂第四册(1991)。由丹参(500 g)、川芎(500 g)和葛根(500 g), 加水煎煮2次, 第1次1.5 h, 第2次1 h 合并煎液, 滤过, 滤液浓缩至相对密度为1.08, 趁热滤过, 滤液浓缩至相对密度为1.38~1.40的浸膏, 加入蔗糖粉适量, 制成颗粒, 低温干燥制成1 000 g, 即得。另有国家食品药品监督管理局标准3份, 处方均由“丹参、川芎、葛根”3味

药组成, 加水煎煮2次后, 浓缩制成浸膏与蔗糖或糊精, 低温干燥或喷雾干燥制成颗粒。

通脉颗粒处方中葛根有升阳止泻、通经活络的作用, 配川芎活血行气、祛风止痛, 丹参活血祛瘀、通经止痛, 其中葛根为方中君药, 丹参、川芎共为方中之臣药, 三药配伍能活血、行气、升阳, 协同作用相得益彰, 共奏活血通脉之功效^[1]。

收稿日期: 2016-03-01

基金项目: 辽宁省自然科学基金优秀人才培养项目(2015020698)

作者简介: 王志成, 大连人, 硕士, 主管中药师, 从事药物分析。

*通信作者 史琳, 沈阳人, 博士, 讲师, 硕士研究生导师, 从事天然药物化学及功能食品研究。E-mail: linnashi@126.com

本次实验采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱(UFLC-QTOF-MS)^[2-7]结合主成分分析法和 *t* 检验分析法进行分析。即将物理或抽象对象的集合分组成为由类似的对象组成的多个类的分析过程,最终使同类样品相聚集,不同类样品相分离,同时联合 *t* 检验方法,建立快速区分不同生产企业通脉颗粒的方法,为通脉颗粒的质量评价提供新依据^[8-10]。

1 仪器与材料

UFLC 系统(Shimadzu)和 Triple TOF 5600 质谱系统(AB Sciex)。电子天平 Sartorius BP211D[®], BP211S。超声仪为昆山禾创超声仪器有限公司(40 kHz, 500W)。甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为超纯水。芒柄花素(formononetin, 批号 111703-200603)、大豆苷元(isoflavoues Aglycone, 批号 111502-200402)、染料木素(Genistein, 批号 111704-201302)、大豆苷(Daidzin, 批号 111738-01302)、葛根素(Puerarin, 批号 110752-201313)、染料木苷(Genistin, 批号 110709-200501)、原儿茶醛(Protocatechuic aldehyde, 批号 110810-201007)、丹酚酸 B(Salvianolic acid B, 批号 111562-201514)、川芎嗪(Ligustrazine, 批号 110817-201307)、藜本内酯(Ligustilide, 批号 111737-201507)购自中国食品药品检定研究院。通脉颗粒为市售(来自国内 10 个生产企业的 61 批次样品,生产企业以英文字母 A~J 表示)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent proshell 120 (100 mm×3.0 mm, 2.7 μm), 柱温 40℃。流动相 A 为含 0.02 mol/L 乙酸钠的 0.2%甲酸溶液, B 为甲醇, 梯度洗脱: 0→1 min, 5% B; 1→8 min, 5%→40%B; 8→14 min, 40%→60% B; 14→18 min, 60%→70% B; 18→22

min, 70%→96%B; 22→26 min, 95%→95% B; 26→26.1 min, 95%→5%B; 26.1→30 min, 5% B。体积流量 0.4 mL/min, 进样量 1 μL。

2.2 对照品和供试品的配制

取芒柄花素、大豆苷元、染料木素、大豆苷、葛根素、染料木苷、原儿茶醛、丹酚酸 B、川芎嗪、藜本内酯各 1 mg 置 20 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,作为对照品溶液。

取供试品 1 g, 加 65%乙醇 10 mL, 超声处理 20 min, 放冷, 滤过, 作为供试品溶液。

2.3 试验条件的选择

质谱条件 ESI⁺, 雾化温度 600℃, 雾化电压 5 500 V, DP 40, 数据采集范围 *m/z* 80~1 000, 循环时间 0.5 s。

提取溶剂和提取方法的选择 分别考察 30%乙醇、65%乙醇和甲醇作为提取溶剂, 超声提取 20 min 和水浴加热回流 20 min。结果显示 65%乙醇超声提取 20 min 作为制备方法, 各成分的丰度较大。

2.4 已知成分的鉴定

由于通脉颗粒在制剂过程中经过煎煮和浓缩等过程, 有些成分可能发生变化, 最终通过对比保留时间和一、二级质谱图, 鉴定出通脉颗粒中 6 个已知成分, 见表 1。

2.5 数据分析

得到原始色谱图谱后, 根据样本间保留时间、色谱峰离子响应情况及二级质谱图采集情况; 将各组数据的总离子流图导入 Markerview 软件, 并设置原始图谱参数, 最小保留时间为 1.0 min, 最大保留时间为 25.0 min, 质荷比容差为 10×10^{-6} , 最大峰数目 5 000, 去除同位素峰后, 对数据进行分组并设置组标志, 完成对数据的标准化处理; 利用 PCA 数据分析, 选取 Pareto 方法对数据进行缩放, 得到 PCA-DA 模型的得分图和载荷图。

表 1 通脉颗粒中的已知成分

Table 1 Components of Tongmai Granule

| 峰号 | <i>t_R</i> /min | 相对分子质量 | 成分 | Mass accuracy/($\times 10^{-6}$) | 分子式 | 离子类型 |
|----|---------------------------|-----------|-------------------------|------------------------------------|---|--------------------|
| 1 | 12.67 | 255.066 1 | Daidzein | 3.6 | C ₁₅ H ₁₀ O ₄ | [M+H] ⁺ |
| 2 | 9.50 | 417.119 1 | Daidzin | 2.6 | C ₂₁ H ₂₀ O ₉ | [M+H] ⁺ |
| 3 | 8.50 | 417.118 7 | Puerarin | 1.7 | C ₂₁ H ₂₀ O ₉ | [M+K] ⁺ |
| 4 | 10.46 | 433.113 5 | Genistin | 1.3 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ | [M+H] ⁺ |
| 5 | 5.46 | 139.038 9 | Protocatechuic aldehyde | -0.5 | C ₇ H ₆ O ₃ | [M+H] ⁺ |
| 6 | 11.53 | 736.189 2 | Salvianolic acid B | 2.7 | C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆ | [M+H] ⁺ |

由供试品色谱图(图1)可见,各批次通脉颗粒中组分分离度良好、峰形对称。采用PCA-DA方法对其进行聚类分析,从得分图(图2)观察样品的聚类和离散程度,可见本次实验所建立的PCA模型聚类良好,不同生产企业的通脉颗粒被很好的区分开,同一生产企业的样品均相近聚类。该聚类结果体现了不同生产企业的差异性和同一生产企业的相似性。PCA模型的载荷图(图3)体现了各成分对分离结果贡献的大小,距原点越远该成分对分类结果的影响越大,通过对比这些差异性成分的相对含量,可快速的评价通脉颗粒的质量。

由Markerview软件的PCA分析图可以把10个生产企业的61批次样品分为3组。以PC1 Score为依据,可以将生产企业C、生产企业F、生产企业G和生产企业H分为一组(PCA图中以圆形显示,编为第1组),由PCA分析图明显看出这4个生产企业与其他6个企业差别明显。剩余的6个企业再以PC2 Score为依据,又可以将生产企业E、生产企业I和生产企业J(PCA图中以三角形显示,编为第2组)与生产企业A、生产企业B和生产企业D(PCA图中以方形显示,编为第3组)分为两组。

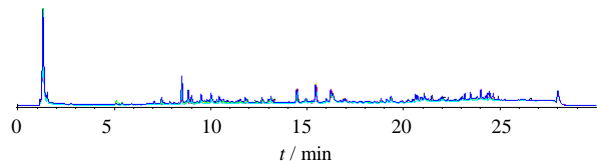


图1 供试品溶液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of sample

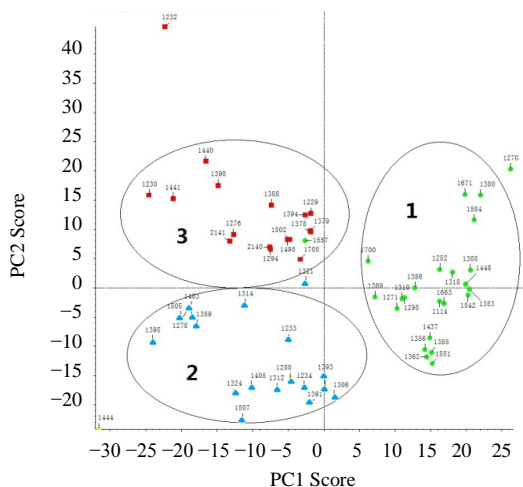


图2 10个生产企业样品的PCA得分图

Fig. 2 PCA-score plot of samples from 10 manufacturers

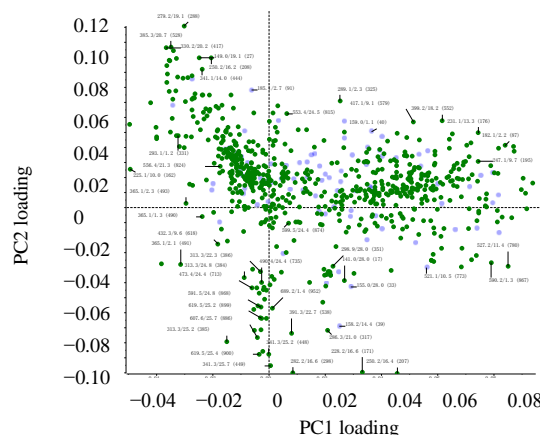


图3 10个生产企业样品的PCA载荷图

Fig. 3 Loading plot of samples from 10 manufacturers

2.6 提取差异性成分

鉴于通脉颗粒的执行标准中,丹参、川芎和葛根3味药均是以水煎煮后浓缩制粒的,所以重点寻找极性较大的差异性成分。葛根中异黄酮类的糖苷成分较多,丹参中的水溶性提取物主要包括单酚酸类和多酚酸类成分。初步对保留时间在7.0~12.0 min的差异性成分进行重点考察。

通过t检验,对全部61批次样品进行分析,筛选P值小于0.05和强度大于1 000的离子,共13个可能的成分,见表2。本次实验只针对含有C、H、O 3种元素的化学成分进行分析,进一步通过已知化学成分的谱库检索确定其中的6个成分,通过进一步的分析确定结构,它们的含量趋势可以作为评价质量依据,见图4。由于葛根药材中的糖苷类成分的主要以异黄酮糖苷的形式存在,经一级、二级谱图比对,推测C₂₆H₂₈O₁₃为大豆素8-C-芹糖(1,6)-O-葡萄糖苷^[11],C₂₆H₂₂O₁₀为1,5-Anhydro-1-[5,7-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-8-yl]hexitol,见图5。

由图4可见,6种差异性成分在第一组生产企业样品中的含量较高,其中大豆素8-C-芹糖(1,6)-O-葡萄糖苷为葛根药材中的成分^[11]。在《中国药典》2015版一部中,以葛根素为指标性成分评价葛根药材质量,通过对葛根药材中其他成分的评价能更全面的反映通脉颗粒中葛根的质量。

2.7 PCA聚类分析与含量测定结果的对比

由PC-score分组结果与采用超高效液相色谱法测定原儿茶醛、丹酚酸B、葛根素和大豆苷含量的

表2 各生产企业通脉颗粒的成分差异表

Table 2 The different components of Tongmai Keli

| 峰号 | t_R/min | 测量相对分子质量 | 理论相对分子质量 | 精确度($\times 10^{-6}$) | 分子式 | 离子类型 |
|----|-----------|-----------|-----------|-------------------------|----------------------|-----------|
| 1 | 7.40 | 243.122 9 | 243.122 7 | 0.8 | $C_{12}H_{18}O_5$ | $[M+H]^+$ |
| 2 | 7.53 | 433.113 5 | 433.112 9 | 1.3 | $C_{21}H_{20}O_{10}$ | $[M+H]^+$ |
| 3 | 7.54 | 491.166 3 | 491.167 8 | -3.0 | $C_{23}H_{32}O_9$ | $[M+K]^+$ |
| 4 | 7.93 | 579.171 3 | 579.170 8 | 0.8 | $C_{27}H_{30}O_{14}$ | $[M+H]^+$ |
| 5 | 8.50 | 417.119 0 | 417.118 0 | 2.4 | $C_{21}H_{20}O_9$ | $[M+H]^+$ |
| 6 | 8.78 | 227.128 8 | 227.127 8 | 4.5 | $C_{12}H_{18}O_4$ | $[M+H]^+$ |
| 7 | 9.08 | 549.160 7 | 549.160 3 | 0.8 | $C_{26}H_{28}O_{13}$ | $[M+H]^+$ |
| 8 | 9.56 | 417.119 0 | 417.118 0 | 2.4 | $C_{21}H_{20}O_9$ | $[M+H]^+$ |
| 9 | 9.66 | 629.184 7 | 629.186 5 | -2.8 | $C_{31}H_{32}O_{14}$ | $[M+H]^+$ |
| 10 | 10.08 | 225.112 9 | 225.112 1 | 3.4 | $C_{12}H_{16}O_4$ | $[M+H]^+$ |
| 11 | 10.37 | 637.213 3 | 637.218 6 | 0.9 | $C_{23}H_{40}O_{20}$ | $[M+H]^+$ |
| 12 | 11.62 | 475.160 7 | 475.159 9 | 1.7 | $C_{24}H_{26}O_{10}$ | $[M+H]^+$ |
| 13 | 11.94 | 495.129 1 | 495.128 6 | 1.1 | $C_{26}H_{22}O_{10}$ | $[M+H]^+$ |

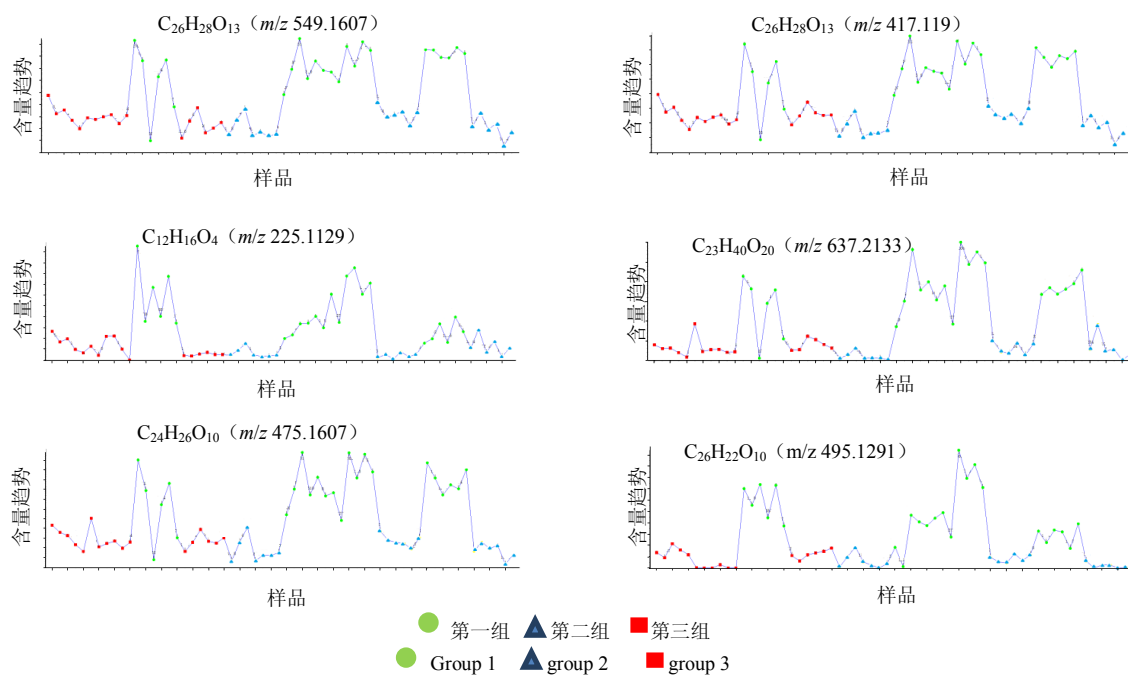


图4 6种差异性成分的含量对比图

Fig. 4 Comparison on contents of six different components

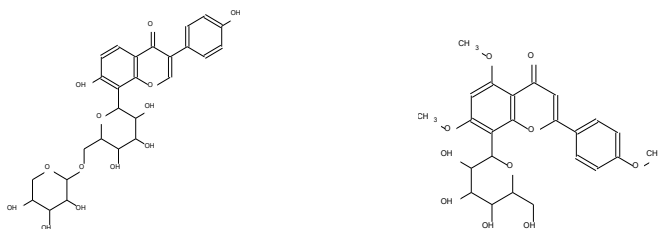


图5 大豆素 8-C-芹糖(1,6)-O-葡萄糖苷 (A) 和 1,5-Anhydro-1-[5,7-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-8-yl]hexitol (B) 结构图

Fig. 5 Structure of Daidzein 8-C-apiosyl(1,6)-O-glucoside (A) and 1,5-Anhydro-1-[5,7-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-8-yl]hexitol (B)

表3 含量测定结果与PCA分组的对比情况

Table 3 Comparison on determination result and PCA grouping

| 生产单位 | 抽样批次 | 不合格批次 | 不合格率/% | PCA 分组情况 |
|--------|------|-------|--------|----------|
| 生产企业 A | 26 | 26 | 100 | 3 |
| 生产企业 B | 5 | 5 | 100 | 3 |
| 生产企业 C | 12 | 0 | 0 | 1 |
| 生产企业 D | 27 | 24 | 89 | 3 |
| 生产企业 E | 8 | 8 | 100 | 2 |
| 生产企业 F | 10 | 2 | 20 | 1 |
| 生产企业 G | 16 | 0 | 0 | 1 |
| 生产企业 H | 9 | 0 | 0 | 1 |
| 生产企业 I | 14 | 7 | 50 | 2 |
| 生产企业 J | 13 | 12 | 92 | 2 |

结果(测定了47家企业219批次的样品,按平均值的70%作为判定依据,对实验结果进行分析)进行比对,见表3。由PC1 Score为依据的分组结果与采用超高效液相色谱法测定的结果一致。

3 讨论

通脉颗粒现行标准共4份,《卫生部药品标准》中药成方制剂第四册中并无鉴别或含量测定项目,其余3份标准检验指标成分与含量测定限度差异较大,存在质量标准过低无法全面控制药品质量的问题。由于标准制法中对生产关键点与风险点未有明确量化规定,企业根据生产实际情况制定了各自工艺参数与工艺流程,又加之质量标准含量测定无统一限度规定,企业对中间体、成品的控制存在差异。

UPLC-Q-TOF-MS分析方法相较传统含量测定,主要优势有:1、不需要对照品,通过TOF-MS提供的精确质量数,通过一、二级质谱的比对可推测化合物;2、节省实验时间,只需一次实验就可以通过数据分析软件找出相似或差异性成分,而且分析结果与含量测定结果基本一致。

本次试验探索以采用UPLC-QTOF-MS采集数据,结合主成分分析法对通脉颗粒的质量进行评价,以t检验分析的方法提取主要的差异性成分。以PC1 Score为依据对不同生产企业的通脉颗粒进行分组和差异性成分含量结果与超高效液相色谱法含量测定的实验结果基本吻合。本方法可以作为评价性试验的一个分类和质量评价方法。

参考文献

[1] 中国药典[S]. 一部. 2015.

- [2] 朱云祥,陈璐琳,龚婧如,等. LC-Q-TOF-MS及LC-IT-MS分析酸枣仁汤的化学成分[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 457-465.
- [3] 任伟光,武拉斌,降雪,等. 豨莶草及其酒炙品UPLC-Q-TOF/MS分析[J]. 中草药, 2014, 45(2): 181-187.
- [4] 闫利利,史家文,王金芳,等. 基于UPLC/Q-TOF-MSE方法分析半夏泻心汤的化学成分[J]. 药学学报, 2013, 48(4): 526-531.
- [5] 陈丽丽,程显隆,韩立炜,等. UPLC-QTOF-MS结合主成分分析法用于白芍饮片的分级科学性研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(5): 794-797.
- [6] 马增春,周思思,梁乾德,等. 基于UPLC-TOF/MS分析人参附子配伍减毒的物质基础[J]. 药学学报, 2011, 46(12): 1488-1492.
- [7] 李明潺,王玉丽,郭春宏,等. UPLC-Q-TOF-MS法同时测定平消片中7种成分[J]. 中草药, 2015, 46(11): 1625-1628.
- [8] 芮雯,冯毅凡,石忠峰,等. 不同产地黄芪药材的UPLC/Q-TOF-MS指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 607-611.
- [9] 单晨啸,崔小兵,柴川,等. 基于UPLC/Q-TOF-MS分析麸炒北苍术的成分变化[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2703-2707.
- [10] Zhang J, Wang P, Wei X, et al. A metabolomics approach for authentication of *Ophiocordyceps sinensis* by liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Food Res Int*, 2015, 76: 489-497.
- [11] 李蓓佳,向诚,杨秀伟,等. 应用高效液相色谱-质谱联用技术研究通脉颗粒的指纹图谱[J]. 药学学报, 2010, 45(11): 1410-1414.