

• 药剂与工艺 •

HPLC-MS/MS 多组分定量测定结合化学计量学研究市售小金丸的质量一致性

熊茜¹, 潘媛¹, 张婷¹, 杨明², 谭庆昌¹, 许润春¹, 张定堃^{1*}, 韩丽^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 建立 HPLC-MS/MS 同时测定小金丸中藁本内酯、原儿茶酸、肌苷、齐墩果酸、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱 10 种成分的检测方法, 并结合聚类分析、主成分分析 (PCA) 等化学计量学方法对不同厂家、不同批次小金丸的质量一致性进行评价。 **方法** 建立 HPLC-MS/MS 方法同时测定小金丸中 10 种活性成分的量。采用 Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈; 质谱采用 ESI⁺ 多反应监测 (MRM) 模式扫描, 并对定量测定结果进行聚类分析和 PCA, 综合评价市售小金丸质量的差异性。 **结果** 方法学验证结果显示, 10 个化合物在各自质量浓度范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.990$); 定量限为 0.01~4.49 ng/mL, 平均回收率在 94.82%~104.33%。样品测定结果表明 A 厂家小金丸质量与其他厂家存在较大差异, PCA 降维处理后所得荷载图中, 苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、乌头碱、肌苷等组分分离原点距离最远, 其量的差异是导致一致性差异的主要成分。 **结论** 市售小金丸质量一致性较差, 各厂家在小金丸生产过程中应加强对制草乌和地龙药材的质量控制。

关键词: 小金丸; HPLC-MS/MS; 定量测定; 化学计量学; 一致性评价; 聚类分析; 主成分分析; 藁本内酯; 原儿茶酸; 肌苷; 齐墩果酸; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰次乌头原碱; 苯甲酰乌头原碱; 新乌头碱; 次乌头碱; 乌头碱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)11-2189-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.006

Consistency evaluation of commercially Xiaojin Pills using determination of multicomponent contents by HPLC-MS/MS method coupled with chemometrics

XIONG Xi¹, PAN Yuan¹, ZHANG Ting¹, YANG Ming², TAN Qing-Chu¹, XU Run-chun¹, ZHANG Ding-Kun¹, HAN Li¹

1. State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective An HPLC-MS/MS method was established for determination of 10 kinds of components in Xiaojin Pills such as ligustilide, protocatechuic acid, inosine, oleanolic acid, benzoyl neotidine, benzoyl aconitrate, benzoyl aconitine, neoaconitine, hypaconitine, aconitine, and combined with cluster analysis, principal component analysis (PCA) and other chemical metrology methods to assess the quality consistency of different batches of Xiaojin Pills from different manufacturers. **Methods** The HPLC-MS/MS method was established for the simultaneous determination of 10 active ingredients in Xiaojin Pills. The Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used; 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile as mobile phase; The mass spectrum was scanned by ESI⁺ multiple reaction monitoring (MRM) mode. And the content analysis was

收稿日期: 2017-01-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81274098); 国家基础科学人才培养基金 (J13100340-19)

作者简介: 熊茜 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新技术、新工艺研究。Tel: 18380445513 E-mail: 2452136086@qq.com

*通信作者 张定堃 E-mail: 465790643@qq.com

韩丽 E-mail: hanliyx@163.com

carried out by cluster analysis and principal component analysis, and the difference of the quality of commercially available Xiaojin Pills was evaluated comprehensively. **Results** The methodological validation results showed that the linear range of 10 compounds was good ($R^2 > 0.990$). The limit of quantification was 0.01—4.49 ng/mL, and the average recovery was 94.82%—104.33%. The results showed that the quality of Xiaojin Pills in a factory was different from others. Benzoyl aconitine, benzoyl aconitine, aconitine and inosine were the main components of classification. The load chart after PCA reduced dimension processing showed that the content of benzoyl neatidine, benzoylthioate, aconitine and inosine were the most distant from the origin, and the difference in content was the main cause of the difference in quality consistency. **Conclusion** Considering the poor quality consistency of Xiaojin Pills, the quality control of *Aconiti Kusnezoffii Radix* and *Lonicerae Radix* should be strengthened in the production of Xiaojin Pills.

Key words: Xiaojin Pills; HPLC-MS/MS; quantitative determination; chemometrics; consistency evaluation; cluster analysis; principal component analysis; ligustilide; protocatchuic acid; inosine; oleanolic acid; benzoyl neatidine; benzoyl aconitrate; benzoyl aconitine; neaconitine; hypaconitine; aconitine

小金丸为清代王洪绪《外科证治全生集》记载的经典名方，由人工麝香、乳香（制）、没药（制）、五灵脂（醋炒）、地龙、制草乌、枫香脂、木鳖子（去壳去油）、当归（酒炒）及京墨 10 味药材制成，具有活血化瘀、散结消肿止痛等功效，主要用于治疗痰气郁结所致的乳癖、乳岩等病症，是目前临床治疗乳腺疾病的首选中成药^[1-2]。小金丸组方复杂，药味组成特殊，包含贵细药、树脂树胶类药物、动物药、粪便类药物、植物药、矿物药；不少药物缺乏有效的质控标准，质量参差不齐。此外，这些药物的质地、比重、黏性、油性、粉碎规律等性质差异较大，使得制备工艺中的混合均匀性差，导致小金丸质量可控性差。

质量控制是制约中药现代化发展的重要瓶颈问题^[3-4]。其中，很重要的内容就是保证产品的质量一致性。药品质量一致性是确保临床疗效稳定可靠、基础与临床试验结果可重复的重要前提^[5-6]。对于中成药而言，原料药质量的一致性与生产工艺的可控性是确保中成药品质一致性的关键^[7-8]。

目前，对于中成药质量一致性评价方法已有诸多探索，具体包括指标成分的定量测定、近红外光谱法、拉曼光谱法、颜色气味的客观评价以及生物评价方法等^[9-14]。这些方法从不同角度为质量一致性的评价提供了参考标准^[15]。结合小金丸的复杂情况，仅从单酯型生物碱量、阿魏酸量等方面评价市售小金丸混合均匀性，所选指标较少，尚不能对其作出全面充分的评价^[16-17]。当下，液质联用分析技术发展迅速，反应灵敏，响应值高，分析速度快，大大拓宽了待检成分的检测限（LOD）与定量限（LOQ），扩大了可用于一致性评价的化学活性成分选择范围；结合化学计量学的分析方法，有利于对数据进行充分地挖掘，实现全面、快速、准确评价

中成药一致性^[18-19]。基于此，本实验建立了 HPLC-MS/MS 法对小金丸中活血药当归中藁本内酯，活血化瘀药五灵脂中原儿茶酸，通络药地龙中肌苷，散结消肿药木鳖子中齐墩果酸，制草乌中毒性药效成分苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱 10 种成分的量同时进行研究。比较了不同厂家、不同批次小金丸活性成分量差异，以期小金丸的质量控制提供科学依据，为药企投料提供合理建议，也为其他类别中成药一致性评价提供新的思路。

1 仪器与试剂

Agilent1260 高效液相色谱仪，配有在线脱气机，四元泵，自动进样器，美国 Agilent 公司；Agilent6460C 三重串联四极杆液质联用仪，配有 ESI 离子源，美国 Agilent 公司；BP211DAG 型电子分析天平，德国 Satorius 公司；KQ-300DA 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司。

对照品新乌头碱（mesaconitine，MA，批号 111795-200901）、乌头碱（aconitine，AC，批号 111794-200901）、次乌头碱（hypaconitine，HA，批号 111796-201303）、苯甲酰新乌头原碱（benzoylmesaconitine，BMA，批号 110799-201106）、苯甲酰乌头原碱（benzoylaconitine，BAC，批号 110720-201111）、苯甲酰次乌头原碱（benzoylhypaconitine，BHA，批号 110798-201106）购于中国食品药品检定研究院。肌苷（creatinine，Cr，批号为 151014）购于成都植标化纯有限公司；齐墩果酸（oleanolic acid，OA，批号 1506230302）、原儿茶酸（protocatechuic acid，PA，批号 15121808）、藁本内酯（ligustilide，Lig，批号 15092501）购于成都普瑞法科技开发有限公司。以上对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。乙腈为色谱纯，Thermo Fisher Scientific

公司; 甲酸为色谱纯, 购于成都市科隆化工试剂厂, 批号为 2016062901; 水为蒸馏水, 购于屈臣氏, 批号为 20160725C。收集共 8 个厂家 (A~H) 23 个批次市售小金丸, 其样品编号及批次见表 1。

表 1 样品的来源及批号信息

Table 1 Origins and batch number of samples

编号	批号	编号	批号	编号	批号
A1	151201	B2	160601	D1	151009No.015
A2	160114	B3	150801.2	D2	151008No.198
A3	160115	B4	151102	E1	20150901
A4	151105	B5	150601.1	E2	20141001
A5	160310	C1	20151003	F1	160401
A6	150905	C2	20160501	G1	15040009
A7	150705	C3	20151002	H1	20151005
B1	160501.1	C4	20160502		

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Technologies Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~1 min, 2%~20% 乙腈; 1~5 min, 20%~50% 乙腈; 5~10 min, 50%~75% 乙腈; 10~15 min, 75%~100% 乙腈; 15~30 min, 100%~2% 乙腈; 体积流量为 0.45 mL/min; 进样前按初始流动相条件平衡 10 min; 柱温 30 °C; 进样量 5 μL。

2.2 质谱条件

离子源为 ESI 源, 正离子模式; 脱溶剂温度 300 °C; 脱溶剂气 N₂ 体积流量 11 L/min; 雾化器压

力 103.425 kPa (15 psi); 毛细管电压 4 000 V; 扫描方式为多反应监测 (MRM); 用于定量分析的检测离子对如表 2 所示。此条件下, 各化合物的 MRM 色谱图见图 1。

2.3 对照品溶液的制备

分别取各对照品适量, 精密称定, 用色谱甲醇配制成含 Lig 99.8 μg/mL、PA 101.0 μg/mL、Cr 103.0 μg/mL、OA 101.0 μg/mL、BMA 103.0 μg/mL、BHA 101.7 μg/mL、BAC 100.0 μg/mL、MA 108.0 μg/mL、HA 97.0 μg/mL、AC 100.0 μg/mL 的对照品储备液。

2.4 供试品溶液的制备

分别将各批次小金丸粉碎, 过 40 目筛, 各精密称定 0.3 g 粉末, 置具塞离心管中, 精密加入色谱甲醇 5 mL, 称定质量。超声 (功率 300 W, 频率 80 kHz) 提取 30 min, 放冷后再次称定质量, 用色谱甲醇补足减轻的质量, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.5 方法学验证

2.5.1 线性关系考察及 LOD 和 LOQ 测定 取对照品储备液适量, 用色谱甲醇稀释为系列溶液, 得到不同质量浓度梯度的对照品溶液, 在拟定的 HPLC-MS/MS 条件下测定。以待测物的质量浓度为横坐标 (X), 待测物的峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程及相关系数 (r)。同时测定各待测物的定量限 (以信噪比 S/N=10 确定) 和检测限 (以信噪比 S/N=3 确定)。结果见表 3。

2.5.2 精密度试验 将“2.3”项下配制的对照品储备液稀释 10 倍, 按上述检测条件进行分析, 连续进样 6 针, 记录各化合物峰面积, 计算其 RSD 值。结

表 2 小金丸中 10 种成分的质谱数据

Table 2 MS data of 10 constituents from Xiaojin Pills

化合物	相对分子质量	离子源模式	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压/V	碰撞能量/eV
Lig	190.2	ESI ⁺	191.0	90.9	100	15
PA	154.1	ESI ⁺	155.0	98.8	100	8
Cr	268.2	ESI ⁺	268.9	136.9	80	5
OA	456.7	ESI ⁺	457.2	439.2	100	5
BMA	589.7	ESI ⁺	590.3	105.0	205	46
BHA	573.3	ESI ⁺	574.3	105.0	200	46
BAC	603.7	ESI ⁺	604.3	105.0	180	45
MA	631.7	ESI ⁺	632.3	105.1	180	46
HA	615.7	ESI ⁺	616.3	105.0	180	46
AC	645.7	ESI ⁺	646.3	105.1	180	50

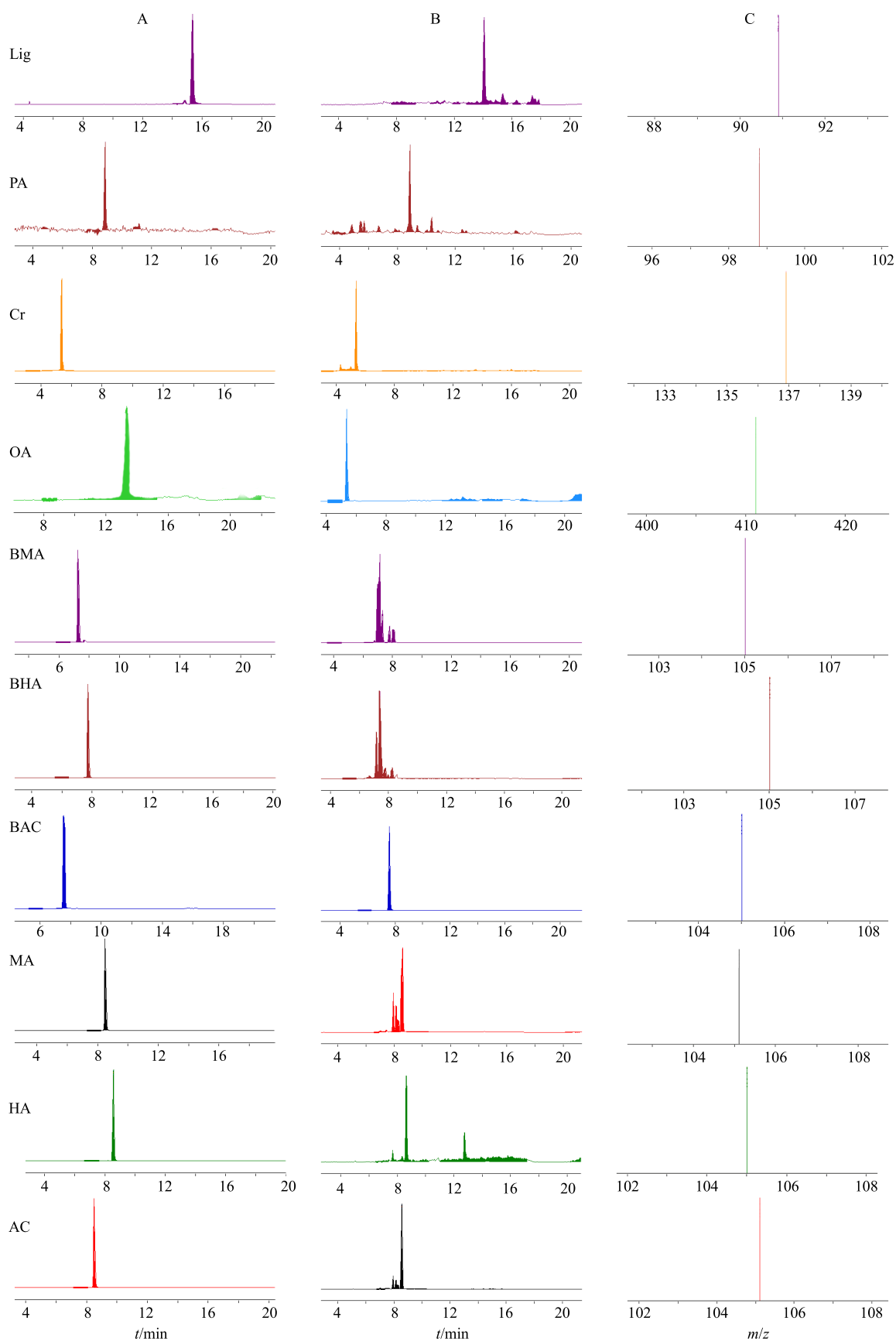


图 1 对照品 (A)、小金丸样品 (B) 的 MRM 色谱图和对照品二级质谱图 (C)

Fig. 1 MRM of reference substances (A) and samples (B) and second mass spectrum of reference substances (C)

表 3 10 种成分的回归方程、相关系数、线性范围、LOD 和 LOQ

Table 3 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, LOD, and LOQ of 10 compounds

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Lig	$Y=9\,164.4X+1\,789.9$	0.998 8	0.025~9.980	0.01	4.49
PA	$Y=5\,919X+1\,726.4$	0.999 5	0.025~10.100	0.01	0.01
Cr	$Y=32\,361X+8\,703.3$	0.997 5	0.258~10.300	10.30	25.75
OA	$Y=6\,307.2X+5\,154.9$	0.998 0	0.026~10.100	1.01	10.10
BMA	$Y=113\,333X-442.27$	0.996 9	0.106~5.246	0.74	3.09
BHA	$Y=74\,457X+16\,811$	0.997 4	0.025~10.167	0.87	3.37
BAC	$Y=119\,045X-2\,953.6$	0.997 8	0.027~10.000	0.71	2.91
MA	$Y=56\,081X-3\,239.3$	0.999 9	0.060~10.811	0.77	3.02
HA	$Y=57\,215X+790.52$	0.999 9	0.024~9.700	0.70	2.70
AC	$Y=61\,492X-2\,907.4$	0.999 9	0.050~10.008	0.79	3.20

果见表 4, 10 种化合物峰面积 RSD 均在 0.538 1%~3.384 0%, 表明该方法精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 精密称定 E 厂家批号为 20141001 的小金丸样品粉末约 0.3 g 制备供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、4、8、12、16、24 h 进行 HPLC-MS/MS 分析, 计算 10 种待测成分峰面积的 RSD, 结果见表 4, 其 RSD 均在 0.726 5%~4.223 2%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.5.4 重复性试验 取 E 厂家, 批号为 20150901 的小金丸样品粉末约 0.3 g, 平行 6 份, 精密称定, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 进行 HPLC-MS/MS 分析, 根据所建立的标准曲线计算待测物质量分数及 RSD, 结果见表 4。10 种待测成分质量分数 RSD 均小于 4.56%, 表明该方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 取 A 厂家, 批号为 160115 的小金丸粉末约 0.15 g, 共 6 份, 精密称定, 置于

10 mL 具塞离心管中, 分别加入相当于该批次小金丸中各成分量的各对照品溶液, 按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 进行 HPLC-MS/MS 分析, 计算各待测物的平均回收率及 RSD, 结果见表 4。10 种待测物的加样回收率在 94.81%~104.33%, RSD 在 1.452 7%~4.875 9%, 表明该方法的准确度良好。

2.6 样品定量测定

取所收集的 23 批市售小金丸, 分别取粉末约 0.3 g, 精密称定。按照“2.4”项下方法制备供试品溶液, 进行 HPLC-MS/MS 分析, 根据所建立的标准曲线计算各样品中待测成分的质量分数, 结果见表 5。

2.7 聚类分析

用 SPSS Statistics 21 分析软件对不同厂家、不同批次小金丸定量测定结果进行系统聚类分析, 结果如图 2 所示。可以看出 A1、A2、A3、A4、A5、

表 4 精密度、稳定性、重复性与加样回收率测定结果

Table 4 Results of precision, stability, repeatability, and recovery

化合物	精密度 RSD/%	稳定性 RSD/%	平均质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	重复性 RSD/%	平均回收率/%	回收率 RSD/%
Lig	0.997 5	3.092 9	3.017 3	3.539 8	94.816 9	1.582 7
PA	3.384 0	3.292 8	15.263 3	4.569 4	96.915 2	4.626 2
Cr	0.856 4	2.603 4	6.363 0	4.482 2	104.332 6	3.975 0
OA	3.044 3	2.397 6	130.412 1	0.612 0	97.285 8	3.144 8
BMA	0.833 1	1.163 7	10.955 4	1.446 4	93.947 9	1.452 7
BHA	0.915 4	0.726 5	3.092 2	1.130 2	97.829 8	3.663 4
BAC	2.176 4	1.763 8	201.484 7	0.910 9	101.550 9	3.898 7
MA	0.465 9	4.223 2	3.096 2	2.469 2	101.508 9	1.985 4
HA	0.997 5	3.092 9	3.017 3	3.539 8	94.816 9	1.582 7
AC	3.384 0	3.292 8	15.263 3	4.569 4	96.915 2	4.626 2

表 5 小金丸中 10 种化合物的定量测定 ($n=3$)Table 5 Contents of 10 investigated compounds in Xiaojin Pills samples ($n=3$)

样品编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)									
	Lig	PA	Cr	OA	BMA	BHA	BAC	MA	HA	AC
A1	2.153 4	28.559 4	13.389 9	UD	10.113 7	2.442 1	217.359 1	5.304 3	0.536 1	4.630 0
A2	10.024 5	22.635 0	52.325 2	439.363 2	7.482 0	2.339 6	219.069 9	8.858 4	0.249 2	7.939 1
A3	10.790 1	14.215 8	35.715 2	355.065 3	5.765 1	1.292 0	186.021 1	6.165 9	0.244 0	5.589 7
A4	2.153 4	18.721 1	4.561 9	47.615 2	7.756 7	0.470 3	159.890 3	3.515 8	UD	3.216 0
A5	22.431 1	11.495 7	45.792 1	453.151 7	7.050 4	3.092 2	235.175 9	9.470 9	0.393 4	8.536 2
A6	2.097 1	14.466 4	28.429 6	40.744 7	11.340 8	0.765 3	179.730 3	3.830 3	UD	3.261 5
A7	0.978 6	10.279 3	22.106 2	38.429 9	23.769 5	5.407 8	50.427 1	2.881 3	0.047 0	2.429 7
B1	6.991 0	16.640 2	32.229 5	425.928 8	26.258 2	11.604 5	3.022 6	1.305 6	0.479 6	1.145 0
B2	5.357 9	14.224 2	24.122 5	284.730 4	20.732 6	8.717 3	4.438 2	1.251 6	0.242 5	0.886 9
B3	2.211 6	8.770 1	18.541 2	32.539 8	3.189 9	UD	1.767 3	1.609 7	UD	1.419 3
B4	3.310 1	8.026 7	31.764 4	0.119 2	26.419 1	9.248 7	4.848 1	1.156 2	0.017 0	1.350 7
B5	4.157 6	13.776 5	16.109 3	9.145 9	3.022 0	UD	10.204 2	1.423 6	UD	1.205 4
C1	1.286 0	12.306 7	0.631 3	31.099 6	1.647 1	UD	2.695 8	1.310 4	0.131 8	1.113 3
C2	17.653 6	12.396 8	11.785 1	382.650 3	3.858 3	8.594 7	4.328 8	1.121 7	0.229 1	0.875 8
C3	0.538 5	31.623 0	UD	70.694 6	0.498 3	UD	1.632 9	1.135 4	0.066 2	0.955 5
C4	17.302 6	7.891 2	58.503 7	75.775 3	62.843 0	2.636 0	15.791 8	4.975 8	UD	0.947 5
D1	19.124 9	53.904 4	3.408 3	82.419 3	11.222 9	2.486 9	7.405 7	1.468 8	2.091 4	1.164 5
D2	26.801 4	22.432 3	5.222 2	UD	20.225 4	2.813 9	7.570 2	1.439 4	2.159 5	1.204 1
E1	UD	26.180 1	0.646 2	10.268 9	15.606 2	0.373 8	2.317 6	1.055 7	0.013 8	0.889 7
E2	2.333 5	39.352 4	UD	11.016 8	8.643 9	4.590 6	27.964 0	1.533 0	0.368 1	1.819 6
F1	11.348 4	25.070 7	15.581 9	293.286 8	28.824 6	22.577 7	10.674 5	1.823 6	2.834 5	1.617 1
G1	3.413 8	13.720 2	22.134 0	24.622 9	28.424 5	15.826 8	27.887 9	3.048 1	0.983 0	2.591 5
H1	54.908 3	14.058 1	27.066 4	23.676 9	0.909 9	UD	14.306 9	2.150 3	UD	1.794 7

UD-未检测到

UD-undetected

A6 与 C2 及其他厂家、其他批次的小金丸差异较大,且 A 厂家各批次之间也有一定差异。而 B 厂家小金丸各批次间差异性较其他厂家小,同时, B、C、D、E、F、G、H 厂家之间的小金丸质量差异性与 A 厂家相比较小。

2.8 PCA

由于 10 种成分在不同厂家、不同批次小金丸中的量不同,趋势也不一致。因此,采用 PCA 法对数据进行降维处理^[20],并观察 23 个批次小金丸样品的自然分组。对不同厂家、不同批次 23 份小金丸样品的进行 PCA 建模。由图 3-A、B 可看出,23 个批次小金丸可分为 2 类。从不同批次小金丸散点分布可以看出, A 厂家小金丸为一类,其他厂家小金丸为一类。从载荷图与得分图的对应关系来看, A 厂

家中 MA、AC 量最高, BAC、Lig、Cr、OA 量也较其他厂家高。其他部分厂家中 HA、BHA、BMA 量较高。从载荷图可看出 BMA、BHA、AC、Cr 等组分离原点距离最远,对不同批次小金丸的分类起主要作用^[21-22],市售小金丸中此类成分量差别较大,要提高不同厂家、不同批次小金丸的质量一致性,需重点控制此类成分的量。其中 BMA、BHA、AC 来自方中温经散寒药制草乌, Cr 来自通络药地龙。

制草乌为方中君药,用量较大,有毒,具有祛风湿、温经止痛的功能。现代研究表明,其所含双酯型生物碱与单酯型生物碱是制草乌抗炎、镇痛的主要活性成分,同时,双酯型生物碱具有较强的毒性,可引起心律失常、心动过速或呼吸麻痹^[23]。因此,在小金丸中对双酯型生物碱、单酯型生物碱的

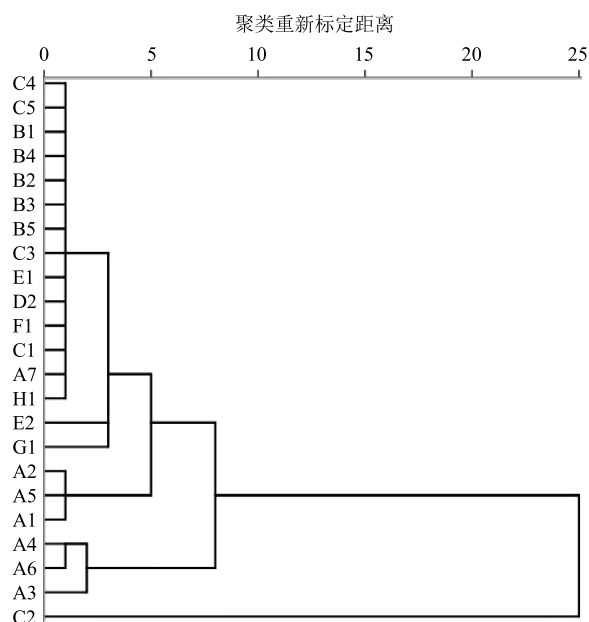


图 2 不同厂家、不同批次小金丸聚类分析结果

Fig. 2 Cluster analysis for Xiaojin Pills from different companies and different batches

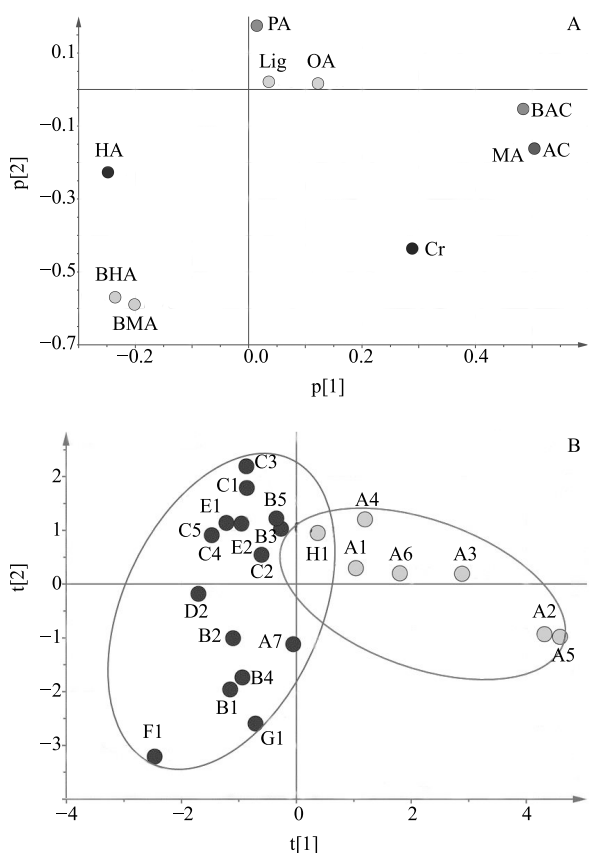


图 3 不同厂家、不同批次小金丸的变量载荷图 (A) 和散点图 (B)

Fig. 3 PCA loading plot (A) and PCA score plots (B) of Xiaojin Pills from different companies and different batches

质量控制很有必要。地龙活血通络,可使寒散络通、痰消瘀化。现代研究表明,地龙具有较好的抗凝血、抗肿瘤、解热镇痛、抗炎作用,同时含有生长因子,具有促进组织修复的作用^[24]。制草乌治疗剂量与中毒剂量较为接近,若炮制不当,可能会引起神经、胃肠道、心血管等多系统的损害,给部分患者带来严重的不良反应。地龙质量控制不当,会降低小金丸治疗效果或带来毒副作用。要控制此类活性成分量,各生产厂家必须从生产源头控制制草乌和地龙质量,严格执行制草乌的相关质量标准,控制制草乌和地龙投料量,以降低市售小金丸的毒副作用,提高其疗效和质量均一性。

3 讨论

本实验采用 HPLC-MS/MS 法对不同厂家、不同批次共计 23 批小金丸中 10 个活性成分进行定量测定。在流动相的选择上,本实验对乙腈、甲醇、不同体积分数甲酸水溶液进行比较,最终结果表明,以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱时,10 种待测成分具有很高的响应值,且能够得到较好峰型。在提取条件的选择上,实验比较了不同浓度的甲醇、乙醇溶液以及时间对提取效果的综合影响,最终确定以纯甲醇溶液,超声提取 30 min 为宜。

中成药质量主要由其中活性成分量决定,绝大多数中成药由多个厂家同时生产,其质量参差不齐,疗效差异较大,甚至出现诸多副作用,给临床用药带来严峻挑战。因此不同厂家药品的一致性评价显得尤为重要。本实验首次建立了一种全面、快速、灵敏度高的 HPLC-MS/MS 分析方法,用于同时测定市售小金丸中 Lig、PA、Cr、OA、BMA、BHA、BAC、MA、HA、AC 10 个活性成分量,为小金丸的质量控制提供了有效的分析手段及科学依据,为药企投料提供合理建议。

借助聚类分析和 PCA 对定量测定结果进行评价,结果表明不同厂家、不同批次小金丸在一些重要化合物的量上存在差异,发现了 BMA、BHA、AC、Cr 等活性成分量是区分各批次小金丸的关键活性成分,揭示了市售小金丸质量差异的客观性。23 个批次小金丸中乌头碱类成分和 Cr 量差异较大,提示各厂家在投料时,要严格把控制草乌和地龙饮片的质量,切实执行相关质量标准,从生产源头进行药品质量控制;在生产阶段可重点对此类含量差异较大的成分进行动态监测,实时控制药品质量均一

性;对于小金丸成品,可增加对此类成分的检测,以客观评估成药质量均一性。因此,厂家可从原料-生产-成药 3 个阶段,高效地、有针对性地小金丸质量一致性进行控制与评价。从源头、生产过程和成品进行乌头碱类成分和 Cr 量监测,能更加客观地评价与提高市售小金丸质量的均一性、保证临床疗效、降低毒副作用。该分析方法对于探讨中成药质量差异性原因具有重要意义,为药企进一步提升药品质量提供建议,为其他类别中成药一致性评价提供新的思路与方法。

志谢:四川大学邹文铨教授对本研究给予指导!

参考文献

- [1] 沈华林,周 婕. 3 种中成药治疗方案用于乳腺增生的成本-效果分析 [J]. 中国药房, 2010, 21(10): 3818-3819.
- [2] 孙利昆,柳 芳,陈文倩,等. 基于 Meta 分析的小金丸治疗乳腺增生疗效评价 [J]. 中国药物评价, 2016, 33(5): 448-451.
- [3] 肖小河,张定堃,王伽伯,等. 中药品质综合量化评控体系—标准评控力金字塔 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 7-12.
- [4] 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.
- [5] 张贻昌,王献耿. 中药产品质量过程控制的重要性 [J]. 中成药, 2012, 34(8): 1581-1585.
- [6] 顾俊非,封 亮,张明华,等. 中药产品“多维结构过程动态质量控制技术体系”构建与应用 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(21): 3613-3617.
- [7] 钟 文,陈 莎,章 军,等. 重点是原料,还是工艺?—以葛根芩连汤为例探讨中成药质量一致性控制方法 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(6): 1027-1032.
- [8] 殷文静,魏惠珍,刘晟楠,等. 原料勾兑在前列舒乐胶囊质量均一性控制中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1315-1320.
- [9] 侯湘梅,岳洪水,张 磊,等. 中药质量一致性评价探讨 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 38-45.
- [10] 张多多,韩秀娟,候雪峰,等. 生物等效性研究方法及其在中药制剂产品中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3712-3719.
- [11] 韩 丽,张 芳,张定堃,等. 中药制剂含量均匀度的测定方法初探 [J]. 中草药, 2014, 45(15): 2125-2331.
- [12] 薛金涛,李春燕,吴纯洁,等. 拉曼光谱在多组分定量分析中方法学验证的探讨 [J]. 光谱学与光谱分析, 2017, 37(1): 120-123.
- [13] 闵 祺,蔺 娟,张学博,等. 多烯酸乙酯软胶囊近红外光谱法一致性评价模型研究 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(9): 1683-1689.
- [14] 黎 量,杨诗龙,胥 敏,等. 基于电子鼻、电子舌技术的山楂气、味鉴别 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 99-102.
- [15] 朱雪国,吴纯伟,梁生旺,等. 中药质量控制的数字化研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 225-229.
- [16] 蔡 博,董林毅,王 静,等. 超高效液相色谱质谱联用技术同时测定小金丸中 7 种成分的含量 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(8): 718-721.
- [17] 任桂林,韩 丽,王小平,等. 小金丸中制草乌单酯型生物碱类成分的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(21): 123-126.
- [18] 王元清,韩 斌,向 荣,等. 总量统计矩结合聚类分析与主成分分析评价虎杖饮片一致性与差异性 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2863-2869.
- [19] 任永申,张 萍,杜小曦,等. 基于 HPLC 指纹图谱的茵栀黄注射液质量一致性和稳定性研究 [J]. 中草药, 2008, 39(6): 837-841.
- [20] Kong W J, Wang J B, Zang Q C, et al. Fingerprint—efficacy study of artificial *Calculus bovis* in quality control of Chinese material medica [J]. *Food Chem*, 2011, 127(3): 1342-1347.
- [21] Zang Q C, Wang J B, Kong W J, et al. Searching for the main anti-bacterial components in artificial *Calculus bovis* using UPLC and microcalorimetry coupled with multi-linear regression analysis [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(33): 3330-3338.
- [22] Kong W J, Jin C, Xiao X H, et al. Determination of multicomponent contents in *Calculus bovis* by ultra-performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and its application for quality control [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(47): 1518-1527.
- [23] 李 谦,过立农,郑 健,等. 乌头属药用植物的研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(7): 1129-1149.
- [24] 张晓晨. 地龙药理与临床研究进展 [J]. 中成药, 2011, 33(9): 1574-1578.