

基于UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS技术的中药复方新天泰1号多类别多成分质量控制方法研究

曾永长^{1,2}, 梁少瑜^{1,2,3*}, 吴俊洪^{1,2}, 卢健滢⁴, 谭晓梅⁵, 罗焕敏³, 吴正治^{1,2*}

1. 深圳大学第一附属医院, 广东 深圳 518035

2. 深圳市老年医学研究所, 广东 深圳 518035

3. 暨南大学, 广东 广州 510632

4. 上海中医药大学, 上海 201203

5. 南方医科大学, 广东 广州 510515

摘要: **目的** 建立同时快速测定新天泰1号制剂中19种药效成分(人参皂苷Rg₁、Rb₁、Rd, 小檗碱、表小檗碱、药根碱、巴马汀、非洲防己碱、黄连碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱、柠檬苦素、金丝桃苷、姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、松果菊苷、毛蕊花糖苷)的超高效液相色谱-电喷雾三重四级杆质谱(UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS)新方法, 为产品提供全面高效的质量控制方法。**方法** 采用Agilent 1290II高效液相色谱系统, Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm), 乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱; 采用正负离子多反应监测模式对各成分特定离子对进行监测, 测定新天泰1号样品中19种活性成分含量。**结果** 在15 min内完成19种活性成分的准确测定, 极大地提高了分析效率; 19种活性成分在线性范围内线性关系良好($r^2>0.999\ 0$); 19种活性成分人参皂苷Rg₁、Rb₁、Rd及小檗碱、表小檗碱、药根碱、巴马汀、非洲防己碱、黄连碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱、柠檬苦素、金丝桃苷、姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、松果菊苷、毛蕊花糖苷的回收率分别为94.80%、96.78%、95.59%、96.88%、97.74%、100.08%、96.27%、100.25%、98.32%、97.16%、95.60%、95.28%、96.81%、95.22%、96.85%、95.31%、93.86%、94.79%、95.20%; 19种成分在3批样品中的定量测定结果分别为2.28~2.49 mg/g、0.82~0.90 mg/g、1.22~1.32 mg/g、14.44~15.50 mg/g、3.71~3.99 mg/g、3.26~3.49 mg/g、3.09~3.33 mg/g、4.39~4.72 mg/g、4.56~4.92 mg/g、0.52~0.57 mg/g、0.30~0.33 mg/g、4.46~4.76 mg/g、3.02~3.24 mg/g、2.59~2.76 mg/g、6.03~6.38 mg/g、1.47~1.58 mg/g、1.90~2.08 mg/g、3.40~3.88 mg/g、1.53~1.74 mg/g。**结论** UHPLC-ESI-MS/MS多反应监测法可同时快速对新天泰1号中多种不同类型的活性成分进行监测, 该方法快速, 灵敏度高, 重复性好, 可用于本品质量控制, 亦为中药质量研究提供参考和借鉴。

关键词: UHPLC-ESI-MS/MS; 新天泰1号; 质量控制; 活性成分; 多反应监测; 人参皂苷; 小檗碱; 表小檗碱; 药根碱; 巴马汀; 非洲防己碱; 黄连碱; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱; 去氢吴茱萸碱; 柠檬苦素; 金丝桃苷; 姜黄素; 去甲氧基姜黄素; 双去甲氧基姜黄素; 松果菊苷; 毛蕊花糖苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)16-3835-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.016

Simultaneous determination of 19 bioactive components of different types in Xintiantai I by UHPLC-ESI-MS/MS

ZENG Yong-chang^{1,2}, LIANG Shao-yu^{1,2,3}, WU Jun-hong^{1,2}, LU Jian-ying⁴, TAN Xiao-mei⁵, LUO Huan-min³, WU Zheng-zhi^{1,2}

1. The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Shenzhen 518035, China

2. Shenzhen Institute of Geriatrics, Shenzhen 518035, China

3. Jinan University, Guangzhou 510632, China

4. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

5. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

收稿日期: 2018-03-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603669, 81574038); 广东省科技厅公益研究与能力建设专项资金新药创制专题项目(2015B020211001); 广东省自然科学基金项目(2017A030313747); 深圳市科技计划项目(JCYJ20160428105555220); 广东省中医药局科研项目(20171235); 深圳市卫生计生系统科研项目(201601052); 深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201612049)

作者简介: 曾永长(1979—), 男, 博士, 工程师, 主要从事复方药效物质基础与药物新制剂开发研究。Tel: (0755)22943039 E-mail: zyc1199@126.com

***通信作者** 吴正治(1964—), 男, 教授, 美国南加州大学高级访问学者, 主要从事老年神经系统疾病中西医结合研究。E-mail: szwzz01@163.com
梁少瑜(1983—), 女, 博士后, 高级工程师, 主要从事老年疾病中医药防治研究。E-mail: lsy1199@126.com

Abstract: Objective To establish an effective UHPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous determination of 19 active components (ginsenoside Rg₁, Rb₁, Rd, berberine, epiberberine, jatrorrhizine, palmatine, columbamine, coptisine, evodiamine, rutaecarpine, dehydroevodiamine, limonin, hyperin, curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, echinacoside, and verbascoside) of different types in Xintiantai I (XI), and provide a comprehensive and efficient quality control method for traditional Chinese medicine (TCM). **Methods** The analysis was performed on an Agilent 1290 system with a Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) at a flow rate of 0.4 mL/min using acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution as mobile phase. Mass spectrometric detection was performed on multiple reaction monitoring (MRM) in positive and negative ionization mode. The contents of 19 active components in XI were determined by monitoring the specific ions of each component. **Results** The 19 active components were accurately determined in 15 min and had the good linearity ($r^2 > 0.999$) within the linear ranges. The average recovery rates of ginsenoside Rg₁, Rb₁, Rd, berberine, epiberberine, jatrorrhizine, palmatine, columbamine, coptisine, evodiamine, rutaecarpine, dehydroevodiamine, limonin, hyperin, curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, echinacoside, and verbascoside were 94.80%, 96.78%, 95.59%, 96.88%, 97.74%, 100.08%, 96.27%, 100.25%, 98.32%, 97.16%, 95.60%, 95.28%, 96.81%, 95.22%, 96.85%, 95.31%, 93.86%, 94.79%, and 95.20%, respectively; The contents of three batches XI of the 19 components were in the ranges of 2.28—2.49, 0.82—0.90, 1.22—1.32, 14.44—15.50, 3.71—3.99, 3.26—3.49, 3.09—3.33, 4.39—4.72, 4.56—4.92, 0.52—0.57, 0.30—0.33, 4.46—4.76, 3.02—3.24, 2.59—2.76, 6.03—6.38, 1.47—1.58, 1.90—2.08, 3.40—3.88, and 1.53—1.74 mg/g, respectively. **Conclusion** The developed UHPLC-ESI-MS/MS-MRM method is fast, sensitive, and reproducible for TCM quality control. It can be used for the quality control of XI, which also provides reference for TCM quality research.

Key words: UHPLC-ESI-MS/MS; Xintiantai I; quality control; active components; multiple reaction monitoring; ginsenoside; berberine; epiberberine; jatrorrhizine; palmatine; columbamine; coptisine; evodiamine; rutaecarpine; dehydroevodiamine; limonin; hyperin; curcumin; demethoxycurcumin; bisdemethoxycurcumin; echinacoside; verbascoside

新天泰 1 号 (Xintiantai I, XI) 是基于老年性痴呆“肝郁化火, 痰浊阻窍”病机, 以清肝解郁、化痰开窍为治则研制的医院制剂, 制剂由黄连、吴茱萸、人参、姜黄、肉苁蓉等中药组成, 临床疗效确切。现代药理研究表明, 人参皂苷、黄连生物碱、吴茱萸生物碱、姜黄素、松果菊苷等可作用于老年痴呆病理发生发展的不同阶段和环节^[1-13], 充分体现中药多成分、多层次、多靶点防治疾病的特点, 它们是 XI 防治老年痴呆的主要活性成分。鉴于现有的质量控制方法 (以 HPLC 法检测含量为主) 难以全面和快速地控制成品质量, 因此, 建立更灵敏、更快速、操作简单且能同时较全面和直接反映中成药有效成分的定性和定量的质控方法, 是中药质量标准研究和控制的趋势^[14], 也是对“中药有效性-物质基础-质控指标”关联度研究的有益探索。

因此, 本研究采用 UHPLC-ESI-MS/MS 多反应监测法同时快速测定制剂中各组方药味的 19 种代表性活性成分 (人参皂苷 Rg₁、Rb₁、Rd, 小檗碱、表小檗碱、药根碱、巴马汀、非洲防己碱、黄连碱、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱、柠檬苦素、金丝桃苷、姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、松果菊苷、毛蕊花糖苷), 为中药复方 XI 的质量控制提供方法学依据。

1 材料与仪器

1.1 试剂与药品

对照品人参皂苷 Rg₁ (批号 20150919)、人参皂苷 Rb₁ (批号 41753-43-9)、人参皂苷 Rd (批号 52705-93-8)、小檗碱 (批号 633-65-8)、表小檗碱 (批号 6873-09-2)、药根碱 (批号 20160613)、巴马汀 (批号 3486-67-7)、非洲防己碱 (批号 3621-36-1)、黄连碱 (批号 3486-66-6)、吴茱萸碱 (批号 518-17-2)、吴茱萸次碱 (批号 84-26-4)、去氢吴茱萸碱 (批号 20160819)、柠檬苦素 (批号 20150601)、金丝桃苷 (批号、20161022)、姜黄素 (批号、458-37-7)、去甲氧基姜黄素 (批号 22608-11-3)、双去甲氧基姜黄素 (批号 33171-05-0)、松果菊苷 (批号 82854-37-3)、毛蕊花糖苷 (批号 61276-17-3)、柚皮苷 (内标, IS-1, 批号 110722-201613)、泼尼松龙 (内标, IS-2, 批号 100153-201603), 各对照品质量分数均大于 98%, 均购自宝鸡市辰光生物科技有限公司。乙腈、甲醇, 色谱纯, Merck 公司; 其他试剂均为分析纯。XI 为深圳市老年医学研究所中药新药研究室研制, 批号 20161114、201700109、20170417。

1.2 仪器

安捷伦 1290II 超高效液相色谱仪-6410B 电喷雾三重串联四极杆质谱仪, 美国 Agilent 公司; BP211D 型 1/10 万电子分析天平, 德国 Sartorius 公

司; XW-80A 型涡旋混合仪, 海门其林贝尔仪器有限公司; H-2K6 二列六孔水浴锅, 巩义市予华仪器有限公司; JP-080ST 洁盟牌超声波清洗机, 深圳市洁盟清洗设备有限公司; N-1100 EYELA 旋转蒸发仪, 日本东京理化公司。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm); 流动相乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~1.5 min, 20%~24%乙腈; 1.5~2.5 min, 24%乙腈; 2.5~8.0 min, 24%~33%乙腈; 8.0~10.0 min, 33%~50%乙腈; 10.0~13.0 min, 50%~80%; 13.0~15.0 min, 80%~100%乙腈; 15.0~17.0 min, 100%~20%乙腈; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 5 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子化源(ESI), 采用多反应检测模式(MRM)进行含量测定, 雾化气温度 340 °C; 雾化气体积流量 8 L/min; 雾化气压力 103.425 kPa (15 psi); 毛细管电压 4 000 V, 电流 95 nA; 扫描范围 m/z 100~1 500; 每种化合物的子离子依据其母离子的碰撞诱导解离优化得到, 用于定量分析的离子对、裂解电压和碰撞能量如下: 人参皂苷 Rg₁ m/z 823.5→643.5, 裂解电压(F)160 V, 碰撞能(CE)45 eV; 人参皂苷 Rb₁ m/z 1 131.5→789.5, F 210 V, CE 60 eV; 人参皂苷 Rd m/z 969.5→789.5, F 290 V, CE 60 eV; 小檗碱/表小檗碱 m/z 336.2→320.2, F 115 V, CE 30 eV; 药根碱/非洲防己碱 m/z 338.1→322.1, F 125 V, CE 29 eV; 巴马汀 m/z 352.2→336.2, F 145 V, CE 28 eV; 黄连碱 m/z 320.1→292.2, F 140 V, CE 30 eV; 吴茱萸碱 m/z 304.2→134.1, F 100 V, CE 15 eV; 吴茱萸次碱 m/z 288.1→273.0, F 120 V, CE 34 eV; 去氢吴茱萸碱 m/z 302.0→286.0, F 110 V, CE 40 eV; 柠檬苦素 m/z 471.2→161.1, F 145 V, CE 25 eV; 金丝桃苷 m/z 465.1→303.1, F 105 V, CE 10 eV; 姜黄素 m/z 369.1→177.1, F 125 V, CE 20 eV; 去甲氧基姜黄素 m/z 339.1→147.1, F 120 V, CE 25 eV; 双去甲氧基姜黄素 m/z 309.1→147.0, F 120 V, CE 25 eV, 以上优选为正离子模式。松果菊苷 m/z 785.0→623.0, F 150 V, CE 6 eV; 毛蕊花糖苷 m/z 623.0→461.0, F 180 V, CE 25 eV, 以上优选为负离子模式。

2.2 对照品及内标溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取各对照品

适量, 甲醇稀释溶解, 得相应对照品储备液。精密吸取各对照品储备液适量, 甲醇稀释成含 0.202 mg/mL 人参皂苷 Rg₁、0.220 mg/mL 人参皂苷 Rb₁、0.203 4 mg/mL 人参皂苷 Rd、0.219 2 mg/mL 小檗碱、0.250 mg/mL 表小檗碱、0.214 4 mg/mL 药根碱、0.225 2 mg/mL 巴马汀、0.246 4 mg/mL 非洲防己碱、0.228 mg/mL 黄连碱、0.246 mg/mL 吴茱萸碱、0.200 mg/mL 去氢吴茱萸碱、0.246 mg/mL 吴茱萸次碱、0.216 mg/mL 柠檬苦素、0.201 6 mg/mL 金丝桃苷、0.252 mg/mL 姜黄素、0.204 mg/mL 去甲氧基姜黄素、0.202 2 mg/mL 双去甲氧基姜黄素、0.167 6 mg/mL 毛蕊花糖苷、0.167 2 mg/mL 松果菊苷的混合对照品溶液。采用等比稀释法制备系列质量浓度对照品混合溶液, 用于绘制标准曲线。

2.2.2 内标溶液的制备 精密量取正离子模式内标柚皮苷和负离子模式内标泼尼松龙适量, 甲醇稀释至质量浓度分别为 400、408 ng/mL 的内标工作液。

2.3 供试品溶液的制备

取 XI 适量, 研细, 精密称取 40 mg 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 柚皮苷内标 200 μL (40.0 μg/mL), 内标泼尼松龙 200 μL (40.8 μg/mL), 2%盐酸溶液 500 μL, 精密称定质量, 超声处理 20 min, 放冷, 再次精密称定质量, 用甲醇补足减失的质量。精密吸取 500 μL 提取液置 5.0 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 待测。

2.4 方法学验证^[15-16]

2.4.1 专属性考察 将空白甲醇、混合对照品溶液、XI 样品, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下条件检测, 结果见图 1、2, 表明该方法 15 min 内完成 19 个成分含量测定, 专属性良好。

2.4.2 线性关系及定量限(LOQ)和检测限(LOD)考察 精密移取混合对照品溶液, 甲醇稀释, 配制系列质量浓度溶液。以分析物质量浓度为横坐标(X), 分析物与内标峰面积比值为纵坐标(Y), 计

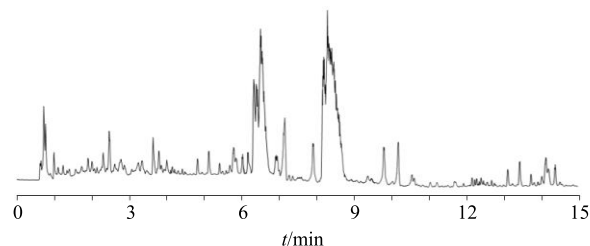


图1 XI 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatography of XI

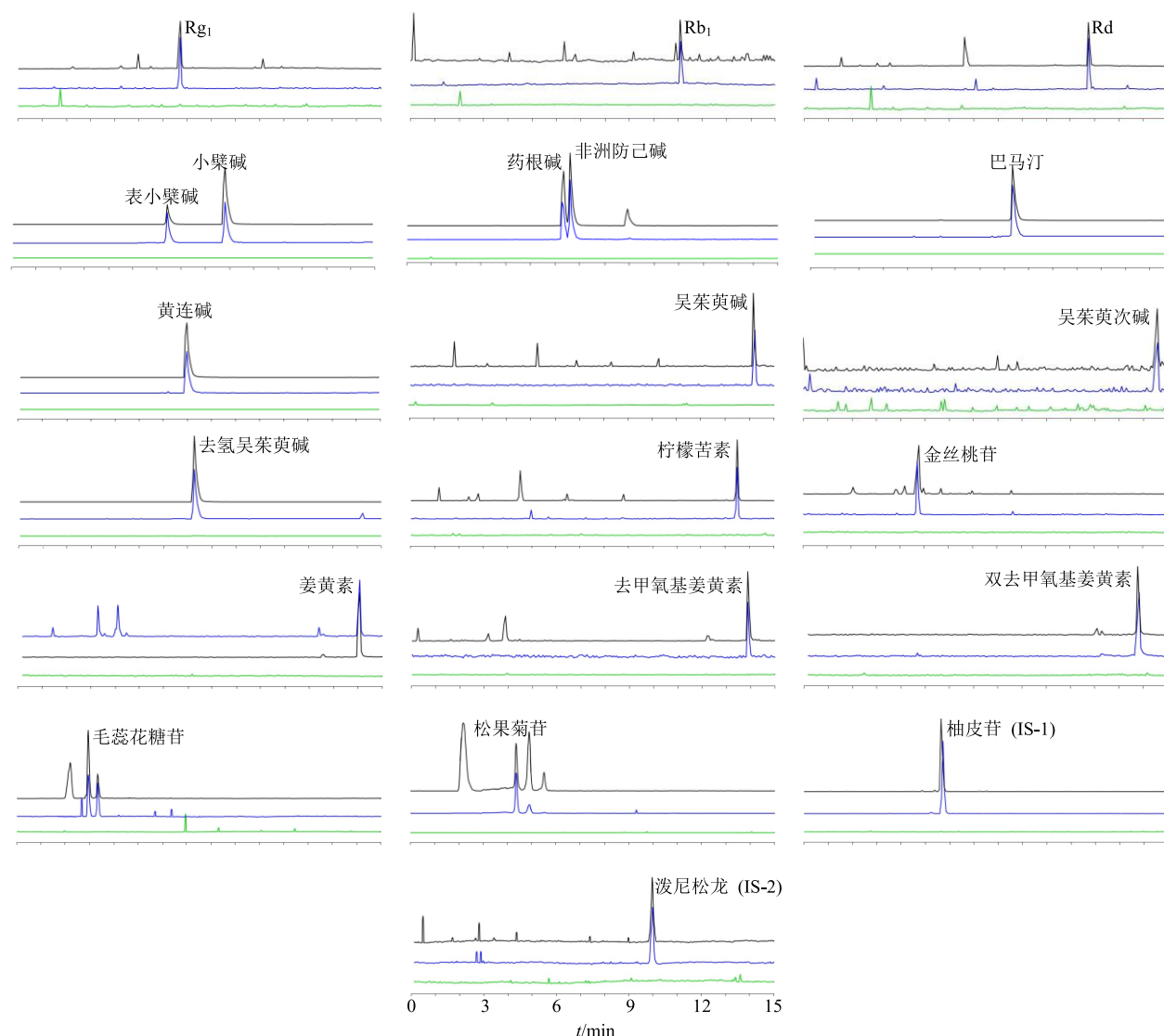


图 2 19 种活性成分及 2 个内标的样品 (上)、混标 (中) 及空白 (下) 溶液的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatogram of 19 analytes and two IS in XI sample (upper), mixed standards (middle), and methanol (lower)

算标准曲线方程。各分析物的标准曲线线性关系良好, $r^2 > 0.999$ 。分析物的线性范围、LOQ 及 LOD 见表 1。

2.4.3 精密度试验 按“2.2”项下方法配制低、高质量浓度的混合对照品溶液, 各取同一份对照品溶液按“2.1”项下条件连续进行 6 次, 计算 RSD 值, 连续考察 3 d, 结果见表 2。19 种成分的日内精密度 RSD 为 0.81%~1.21%, 日间精密度 RSD 为 0.78%~2.81%, 结果表明, 精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一批 XI, 按“2.3”项下方法制备 XI 供试品溶液, 放置于室温, 分别在 0、4、8、24、48 h, 测定各指标成分与内标峰面积比值, 代入回归方程, 计算各种成分的 48 h 内的稳定性, 结果如表 2。

2.4.5 重复性试验 精密称取 XI 样品 6 份, 每份 40 mg, 按照“2.3”项下操作制备供试品溶液, 测定每份供试品溶液中各分析成分与内标峰面积比值, 代入回归方程求得实测质量浓度, 计算其 RSD 值, 结果见表 2, 结果表明供试品制备方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 精密称取已知质量浓度的样品, 分别精密加入高、中、低 3 个质量浓度的混合对照溶液, 每个水平处理 3 份, 共 9 份, 按照“2.1”项下的检测方法进行检测操作, 计算其各指标成分的加样回收率。结果见表 2。

2.5 样品测定

取 3 批 XI (20161114、201700109、20170417), 每批样品制备 2 份供试品溶液 (即 20161114 制备

表 1 19 种成分曲线方程、线性范围、LOQ 及 LOD

Table 1 Linear regression equations, linear ranges, LOQ, and LOD of 19 analytes

检测成分	曲线方程	r^2	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)	LOD/(ng·mL ⁻¹)
人参皂苷 Rg ₁	$Y=0.001\ 5\ X-0.000\ 9$	0.999\ 5	2.020~1\ 010	2.020	0.404
人参皂苷 Rb ₁	$Y=0.001\ 6\ X-0.000\ 5$	0.999\ 4	2.200~1\ 100	2.200	0.550
人参皂苷 Rd	$Y=0.001\ 9\ X+0.000\ 7$	0.999\ 4	2.034~1\ 017	2.034	0.509
小檗碱	$Y=0.407\ 6\ X-0.041\ 8$	0.999\ 9	1.096~1\ 096	1.096	0.110
表小檗碱	$Y=0.204\ X-0.029\ 4$	0.999\ 9	1.250~1\ 250	1.250	0.125
药根碱	$Y=0.229\ 1\ X-0.062\ 7$	0.999\ 8	1.072~1\ 072	1.072	0.134
非洲防己碱	$Y=0.089\ X+0.002\ 3$	0.999\ 8	1.232~1\ 232	1.232	0.123
巴马汀	$Y=0.253\ 2\ X+0.014\ 8$	0.999\ 7	1.126~1\ 126	1.126	0.113
黄连碱	$Y=0.125\ 8\ X-0.011\ 9$	0.999\ 9	1.140~1\ 140	1.140	0.143
吴茱萸碱	$Y=0.031\ 2\ X-0.009\ 2$	0.999\ 8	1.230~1\ 230	1.230	0.410
吴茱萸次碱	$Y=0.009\ 2\ X-0.000\ 3$	0.999\ 9	1.230~1\ 230	1.230	0.308
去氢吴茱萸碱	$Y=0.315\ 1\ X-0.027\ 2$	0.999\ 8	1.000~1\ 000	1.000	0.250
柠檬苦素	$Y=0.003\ 4\ X-0.000\ 4$	0.999\ 7	1.080~1\ 080	1.080	0.360
金丝桃苷	$Y=0.020\ 6\ X+0.005$	0.999\ 9	1.008~1\ 008	1.008	0.336
姜黄素	$Y=0.018\ 7\ X-0.003\ 7$	0.999\ 8	1.260~1\ 260	1.260	0.315
去甲氧基姜黄素	$Y=0.010\ 7\ X-0.004\ 8$	0.999\ 8	1.020~1\ 020	1.020	0.255
双去甲氧基姜黄素	$Y=0.005\ 7\ X+0.000\ 5$	0.999\ 8	1.011~1\ 011	1.011	0.253
毛蕊花糖苷	$Y=0.187\ 8\ X+0.007\ 4$	0.999\ 7	1.676~838	1.676	0.559
松果菊苷	$Y=0.096\ 1\ X-0.008\ 1$	0.999\ 7	1.672~836	1.672	0.557

表 2 XI 19 种成分精密度的、稳定性、重复性及加样回收率 ($n=6$)

Table 2 Precision, stability, repeatability, and recovery of 19 analytes in XI ($n=6$)

检测成分	RSD/%			加样回收率 ($\bar{x} \pm s$)/%	检测成分	RSD/%			加样回收率 ($\bar{x} \pm s$)/%
	精密度	稳定性	重复性			精密度	稳定性	重复性	
人参皂苷 Rg ₁	2.04	3.11	3.30	94.80±4.38	吴茱萸次碱	1.02	2.91	3.18	95.60±4.50
人参皂苷 Rb ₁	1.86	3.05	2.97	96.78±3.83	去氢吴茱萸碱	1.16	3.13	3.65	95.28±4.60
人参皂苷 Rd	1.50	2.48	2.65	95.59±2.45	柠檬苦素	1.89	2.24	2.87	96.81±3.93
小檗碱	1.24	2.26	2.58	96.88±3.53	金丝桃苷	1.87	2.72	3.14	95.22±2.99
表小檗碱	0.81	2.71	3.05	97.74±4.25	姜黄素	1.61	2.08	3.26	96.85±4.23
药根碱	1.68	2.93	2.61	100.08±4.97	去甲氧基姜黄素	1.63	3.42	2.93	95.31±3.15
非洲防己碱	1.02	2.08	2.37	96.27±3.88	双去甲氧基姜黄素	1.38	3.05	3.29	93.86±3.61
巴马汀	1.72	2.15	2.69	100.25±4.81	毛蕊花糖苷	1.85	3.31	3.64	94.79±4.17
黄连碱	1.53	2.54	3.23	98.32±4.30	松果菊苷	1.84	3.15	3.83	95.20±3.29
吴茱萸碱	1.02	3.19	3.66	97.16±3.78					

1[#]、2[#]；201700109 制备 3[#]、4[#]；20170417 制备 5[#]、6[#]），每份样品进样 2 针（即“双样双针”法），取其平均值，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，进样 5 μ L，测定 19 种活性成分含量，结果见表 3，结果说明该方法能准确检测 19 个不同类型成分的量；由于该方法以 MS 为检测器，所以检出限和定量限的灵敏度大幅度提高，可适用于微量成分检测；采用的 MRN 离子选择模式，可以排除非目标离子成分的干扰，以对照品为参照，可以快速、准确地完

成定性和定量，对简化中药质量控制和提高效率具有重要的实际意义。

3 讨论

3.1 UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS 技术是质量控制的高效方法

目前中药新药质量标准中定性的“鉴别”和定量的“含量测定”，是质量标准中最繁重最耗时的工作，其中定性主要采用薄层鉴别方法（TLC）对制剂处方中的各味药材进行定性的鉴别，要求最终标

表 3 XI 样品含量测定结果

Table 3 Contents of 19 analytes in three batches of XI

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)									
	人参皂苷 Rg ₁	人参皂苷 Rb ₁	人参皂苷 Rd	小檗碱	表小檗碱	药根碱	非洲防己碱	巴马汀	黄连碱	吴茱萸碱
1 [#]	2.49	0.88	1.29	14.48	3.96	3.49	3.24	4.59	4.74	0.56
2 [#]	2.34	0.87	1.32	15.24	3.87	3.26	3.26	4.56	4.92	0.57
3 [#]	2.48	0.88	1.29	15.27	3.71	3.28	3.09	4.53	4.56	0.52
4 [#]	2.28	0.90	1.22	15.50	3.99	3.30	3.18	4.72	4.66	0.57
5 [#]	2.37	0.84	1.26	14.44	3.84	3.38	3.21	4.44	4.64	0.52
6 [#]	2.38	0.82	1.30	15.20	3.93	3.42	3.33	4.39	4.86	0.57
$\bar{x} \pm s$	2.39±0.07	0.87±0.03	1.28±0.03	15.02±0.41	3.88±0.09	3.36±0.08	3.22±0.07	4.54±0.11	4.73±0.13	0.55±0.02

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)									
	吴茱萸次碱	去氢吴茱萸碱	柠檬苦素	金丝桃苷	姜黄素	去甲氧基姜黄素	双去甲氧基姜黄素	毛蕊花糖苷	松果菊苷	
1 [#]	0.30	4.76	3.08	2.74	6.28	1.53	2.08	3.88	1.74	
2 [#]	0.3	4.56	3.24	2.59	6.06	1.47	1.90	3.45	1.54	
3 [#]	0.33	4.52	3.15	2.72	6.02	1.58	1.99	3.48	1.53	
4 [#]	0.32	4.66	3.27	2.76	6.26	1.58	1.96	3.52	1.57	
5 [#]	0.3	4.68	3.02	2.68	6.02	1.5	1.95	3.40	1.59	
6 [#]	0.32	4.46	3.16	2.64	6.38	1.48	1.94	3.61	1.54	
$\bar{x} \pm s$	0.31±0.01	4.60±0.10	3.15±0.09	2.69±0.06	6.17±0.14	1.52±0.04	1.97±0.06	3.56±0.16	1.59±0.07	

准至少能准确鉴别组方药味中的一半以上药味，研究中常常因为 TLC 的重复性、准确性、专属性以及操作过程的繁杂和展开剂环境毒性等问题让人苦恼。含量测定方面主要采用 HPLC，该方法准确度、精密度、重复性各方面都比较好，但存在各被检测成分之间基线分离所需的色谱条件复杂、分析时间较长、不适合将不同类型的多指标成分同时分析（不同类型成分结构差异大，紫外吸收特征差异大，一测多评法仅适合于结构和紫外吸收类似的化合物），示差检测器和蒸发光检测器的检测限、灵敏度、精密度相对较低等问题。到目前为止，随着质谱仪应用的普及中药基础研究和质量标准研究取得很大进步，但中药新药研发和中药产业升级未能跟上基础研究的步伐。目前，《中国药典》2015 年版一部仅【检查】项下重金属及有害元素检查较多采用电感耦合等离子质谱法替代的原来的重金属检查法（0821）和砷盐检查法（0822），快速而准确地测定铅、镉、砷、汞、铜的含量；而在【鉴别】项下，仅阿胶、鹿角胶、龟甲胶等动物药中采用了 LC-MS- MRM 法进行定性鉴别，在【含量测定】项下仅川楝子和苦楝皮中川楝素成分及千里光中微量毒性成分阿多尼付林碱采用了 LC-MS 方法进行定量分析。UHPLC-MS/MS 技术的高灵敏、高选择性、多反应监测等特性在中药质量控制中具有广阔的应用前

景，本研究基于 UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS 技术对被测成分母离子、子离子的高度选择性（定性）和精确定量性，克服上述 TLC 和 HPLC 的局限，探索将现行药典中定量研究（HPLC 含量测定）和定性鉴别（TLC 薄层鉴别）工作基础上，以 MRM 模式，通过空白和对照品的对照，实现对复方制剂 XI 中来自人参、黄连、吴茱萸、姜黄、肉苁蓉中的不同结构类型的 19 种活性成分同时定性定量检测，理论上可以替代繁杂的 TLC 和 HPLC 达到定性定量的目的，大幅提高检验效率，降低人力成本，为中药（新药）质量研究提供参考和借鉴。

3.2 色谱和质谱条件优化

实验过程中对色谱条件及质谱条件进行了考察，考察了甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液 3 种流动相对各分析物的影响，发现乙腈-0.1%甲酸水体系流动相的响应值更高、峰形更好，故选择乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相进行洗脱；正、负离子模式比较发现，松果菊苷和毛蕊花糖苷在负离子模式下灵敏度高，其他各成分在正离子模式下灵敏度高，故分别采用了正、负离子模式下的 2 种内标物进行分析。

3.3 质量控制指标选择

中药复方制剂成分十分复杂，主要通过多成分协同起效。制剂是临床给药的最终形式，向前可以

追溯原料药材中的相关成分, 往后作为复方制剂发挥药效的物质源头, 所以中药复方制剂质量控制应采用多种能被吸收入血且与功能主治或病症有关的化学成分作为质控指标, 以便较准确地反映中药复方制剂药理效应, 使质控指标体现临床效应。因此本研究选用了经现代药理学研究证明具有抑制乙酰胆碱酯酶活性、神经保护和延缓老年痴呆发病进程作用的化学成分作为指标, 建立快速测定方法, 进一步密切中药有效性-物质基础-质量控制指标成分关联度^[17], 今后将进一步研究这些成分是否被吸收入血以及在血中的药动学过程。

3.4 中药饮片混合投料对中成药批间质量均一性的影响

中成药研发要遵循“质量源于设计”的科学理念, 牢记质量是设计和生产出来的, 检测只是最终验证产品是否符合质量标准; 随着对中药质量不断提升, 中成药批间均一是必须要解决的问题, “饮片混合投料”是借鉴日本、欧洲解决天然药物批间均一性的方法, 引起广大中药研究者、生产企业和管理部门广泛关注和讨论, 暂无统一的认识; 不少生产一线人员产生质疑, 认为中药由于产地、加工炮制方法、采收时节、施肥或者病虫害等多因素影响, 批间含量差异很大, 混合投料比例很难把握, 不符合生产实际。根据本课题组结合生产实际研究发现, 如果按照各批次物料含量计算混合投料比例, 且以饮片直接投料, 由于饮片的物理性状(药材大、小、粗、细, 饮片厚薄等)的影响, 批间均一性无法保证, 不适合工业化大生产操作; 但如果在生产中增加一道工序, 即将所有拟投料的饮片(或净制药材)加工成均一的投料“二次物料”的粗粉, 并充分混合, 可确保提取溶媒对物料的渗透系数和浸出参数一致, 在严格控制工艺参数的条件下, 完全可以达到批间含量均一的要求, 且适合工业化大生产; 可为后续中药制剂工艺和质量过程控制提供参考。

参考文献

- [1] Zhao B S, Liu Y, Gao X Y, *et al.* Effects of ginsenoside Rg₁ on the expression of Toll-Like Receptor 3,4 and their signalling transduction factors in the NG108-15 murine neuroglial cell line [J]. *Molecules*, 2014, 19(10): 16925-16936.
- [2] Li L, Liu Z R, Liu J F, *et al.* Ginsenoside Rd attenuates beta-amyloid-induced tau phosphorylation by altering the functional balance of glycogen synthase kinase 3 β and protein phosphatase 2A [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 54: 320-328.
- [3] Jung H A, Min B S, Yokozawa T, *et al.* Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(8): 1433-1438.
- [4] Huang M, Jiang X, Liang Y B, *et al.* Berberine improves cognitive impairment by promoting autophagic clearance and inhibiting production of β -amyloid in APP/tau/PS1 mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Exp Gerontol*, 2017, 91: 25-33.
- [5] Luo T, Shen X, Li S, *et al.* The protective effect of jatrorrhizine against oxidative stress in primary rat cortical neurons [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2016, 16(5): 617-623.
- [6] Yuan S M, Gao K, Wang D M, *et al.* Evodiamine improves cognitive abilities in SAMP8 and APPsw/PS1 Δ E9 transgenic mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Acta Pharm Sin*, 2011, 32(3): 295-302.
- [7] Peng J H, Zhang C E, Wei W, *et al.* Dehydroevodiamine attenuates tau hyperphosphorylation and spatial memory deficit induced by activation of glycogen synthase kinase-3 in rats [J]. *Neuropharmacology*, 2007, 52(7): 1521-1527.
- [8] 刘安昌, 娄红祥, 赵丽霞. 姜黄素药理活性及体内代谢 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2004, 19(1): 1-5.
- [9] 李锦松, 陈剑鸿, 孟民杰. 金丝桃苷药理作用及其作用机制的研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2015, 31(2): 269-272.
- [10] 石慧, 王喜军. 柠檬苦素类化合物的药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2014, 42(4): 128-129.
- [11] 康文静, 梁冰, 李淑芳, 等. 去氢吴茱萸碱及盐酸小檗碱对 D-半乳糖致衰老模型小鼠学习记忆的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(4): 372-374.
- [12] 刘春丽, 陈虹, 姜勇, 等. 松果菊苷对血管性痴呆大鼠行为学、氧自由基以及胆碱能神经递质代谢速率的影响 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(7): 1035-1036.
- [13] 李洋, 洪莉, 刘成, 等. 松果菊苷药理作用研究进展 [J]. 医药导报, 2017, 36(1): 56-60.
- [14] 余一鸣, 胡永慧, 韩立云, 等. 中药质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2557-2563.
- [15] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [16] 尤娇娇, 彭志红, 韩凤梅. HPLC-MS/MS 法同时测定平卧菊三七水提取物中 9 种主要有效成分 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 294-298.
- [17] 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.