

UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合主成分分析的丹灯通脑软胶囊质量评价研究

周霖^{1,2}, 周珮珮^{1,2#}, 王肖辉³, 薛文华^{1,2}, 孙志^{1,2}, 张俊^{1,2}, 左莉华^{1,2}, 梁淑红^{1,2}, 薛连平⁴, 惠洁⁴, 刘克锋^{1,2}, 王松^{1,2}, 张晓坚^{1,2}, 赵杰^{1,2*}

1. 郑州大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450052

2. 河南省精准临床药学重点实验室, 河南 郑州 450052

3. 郑州大学第一附属医院 超声科, 河南 郑州 450052

4. 河南理工大学医学院, 河南 焦作 454000

摘要: 目的 建立基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 的丹灯通脑软胶囊 (DTSC) 中多种活性成分定量分析方法, 并采用主成分分析 (PCA) 法对其质量进行综合评价。方法 采用 Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 以实现化合物的前期分离; 然后通过 Q-Orbitrap MS 正负离子同时监测、一级全扫描及自动触发二级质谱扫描的模式捕捉目标成分的精确相对分子质量及碎片离子信息, 以实现对待测物的准确定性和定量; 最后将定量结果与 PCA 法相结合对不同批次药物进行科学的质量评价分析。结果 在优化的色谱、质谱条件下, 甜菜碱、丹参素、绿原酸、原儿茶醛、葛根素、咖啡酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、槲皮素、芹菜素、洋川芎内脂 A、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮和丹参酮 II_A 分别在 0.018 1~0.578 4、5.555 7~177.782 0、0.018 1~0.580 3、0.002 8~0.089 2、0.787 2~25.191 3、0.000 5~0.016 7、0.007 2~0.228 9、0.065 8~2.105 3、0.304 6~9.747 1、3.888 1~124.417 6、0.000 5~0.016 0、0.000 6~0.018 1、0.002 5~0.080 1、0.019 8~0.632 8、0.032 2~1.031 7、0.102 8~3.290 0、0.044 5~1.422 9 μg/mL 线性关系良好 ($r \geq 0.999\ 2$); 精密度、重复性及稳定性良好 ($RSD \leq 5\%$); 加样回收率在 98%~102%, RSD 均小于 3%; 定量分析结果表明大多数批次药物质量较为稳定, 其中丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 和丹参酮 II_A 对药物质量具有较大影响, 可对其进行重点监控以保证药物批次质量。结论 建立的定量方法灵敏度高且准确性好, 方法学考察结果符合测定要求, 可用于 DTSC 中多种活性成分的快速测定; 并为其质量评价提供新的科学依据和参考。

关键词: UPLC-Q-Orbitrap HRMS; 丹灯通脑软胶囊; 主成分分析; 质量评价; 甜菜碱; 丹参素; 绿原酸; 原儿茶醛; 葛根素; 咖啡酸; 木犀草苷; 迷迭香酸; 丹酚酸 A; 丹酚酸 B; 槲皮素; 芹菜素; 洋川芎内脂 A; 二氢丹参酮 I; 丹参酮 I; 隐丹参酮; 丹参酮 II_A

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)18-4311-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.015

Quality assessment of Dandeng Tongnao Soft Capsule based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with principal component analysis

ZHOU Lin^{1,2}, ZHOU Pei-pei^{1,2}, WANG Xiao-hui³, XUE Wen-hua^{1,2}, SUN Zhi^{1,2}, ZHANG Jun^{1,2}, ZUO Li-hua^{1,2}, LIANG Shu-hong^{1,2}, XUE Lian-ping⁴, HUI Jie⁴, LIU Ke-feng^{1,2}, WANG Song^{1,2}, ZHANG Xiao-jian^{1,2}, ZHAO Jie^{1,2}

1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Henan Key Laboratory of Precision Clinical Pharmacy, Zhengzhou 450052, China

3. Department of Ultrasonography, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

4. Medical college, Henan Polytechnic University, Jiaozuo 454000, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis method of multiple active components in Dandeng Tongnao Soft Capsule (DTSC) based on ultra performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap

收稿日期: 2018-04-25

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目资助 (19A320070); 常州四药临床药学科研基金资助 (CZSYJJ6015); 河南省科技计划项目资助 (182102310243)

作者简介: 周霖, 男, 硕士, 研究方向为中药质量控制。Tel: (0371)66862570 E-mail: zhoulin2018@126.com

*通信作者 赵杰, 男, 主任药师, 教授, 研究方向为医院药学。Tel: (0371)66862570 E-mail: zhaojie@zzu.edu.cn

#并列第一作者 周珮珮, 女, 硕士, 研究方向为中药质量控制。Tel: (0371)66862570 E-mail: zhoupeiyeiyouxiang@163.com

HRMS), and conduct a quality assessment using principal component analysis. **Methods** The column was Acquity UPLC® BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) and the mobile phase was consisted of acetonitrile-water (containing 0.1% formic acid) with gradient elution; the information of accurate mass and fragment ions was obtained by the novel “monitored simultaneously for positive and negative ions, full MS scan and automatic trigger secondary mass spectrometry” mode of Q-Orbitrap MS technology to ensure the accurate qualification and quantitation of the analytes; the results of the contents were then combined with the principal component analysis to achieve the scientific assessment of the different batches of drugs. **Results** Under the optimized conditions, betaine, danshensu, chlorogenic acid, protocatechuic aldehyde, puerarin, caffeic acid, galuteolin, rosmarinic acid, salvianolic acid A, salvianolic acid B, quercetin, apigenin, senkyunolide A, dihydrotanshinone I, tanshinone I, cryptotanshinone, and tanshinon II_A all showed good liner relationship ($r \geq 0.999\ 2$) in the range of 0.018 1—0.578 4, 5.555 7—177.782 0, 0.018 1—0.580 3, 0.002 8—0.089 2, 0.787 2—25.191 3, 0.000 5—0.016 7, 0.007 2—0.228 9, 0.065 8—2.105 3, 0.304 6—9.747 1, 3.888 1—124.417 6, 0.000 5—0.016 0, 0.000 6—0.018 1, 0.002 5—0.080 1, 0.019 8—0.632 8, 0.032 2—1.031 7, 0.102 8—3.290 0, and 0.044 5—1.422 9 μg/mL, respectively; The results of the accuracy, repeatability, and stability all reached the standards (RSD ≤ 5%); The recoveries ranged from 98% to 102% and RSDs were below 3%; The analysis results showed that the quality of the most batches was stable, tanshinone I, cryptotanshinone, dihydrotanshinone I, and tanshinon II_A had a great influence on the quality of the drug, which could be monitored to ensure the quality of different batches. **Conclusion** The methods established in this paper have a high sensitivity and accuracy; the results of the methodology conform to the relevant requirements and the methods can rapidly determinate the multiple active components in DTSC; The research also provides a new scientific basis and reference for the quality assessment at the same time.

Key words: UPLC-Q-Orbitrap HRMS; Dandeng Tongnao Soft Capsule; principal component analysis; quality assessment; betaine; danshensu; chlorogenic acid; protocatechuic aldehyde; puerarin; caffeic acid; galuteolin; rosmarinic acid; salvianolic acid A; salvianolic acid B; quercetin; apigenin; senkyunolide A; dihydrotanshinone I; tanshinone I; cryptotanshinone; tanshinon II_A

丹灯通脑软胶囊 (Dandeng Tongnao Soft Capsule, DTSC) 是由丹参、灯盏细辛、川芎、葛根共 4 味中药经现代工艺提取加工的中药复方制剂, 目前收载于《国家中成药标准汇编》脑系经络肢体分册, 该药具有活血化瘀、祛风通络之功效, 临床上主要用于高血压、冠心病、脑中风以及心绞痛等的治疗^[1-4]。DTSC 疗效确切, 临床应用广泛, 中药有效化学成分复杂, 药物中各类化学成分群之间主要通过互相影响、相互配合的方式共同发挥协同作用, 最终产生“增效减毒”的治疗效果^[5-10]。然而, 查阅相关文献发现, 当前鲜有关于 DTSC 的质量评价研究, 有个别报道仅对该药中的少数成分进行了定量分析, 但这些分析技术存在灵敏度低、选择性差等方面的不足, 且质量评价方法较为落后, 均难以较为科学、全面地反映药物质量, 不能确保药物临床使用的安全有效, 同时严重限制了中药现代化的快速发展^[11-13]。因此, 当前亟需建立一种更加系统、科学的分析方法在对 DTSC 实现多组分同时定量的基础上, 结合先进的模式识别技术对其质量进行全面评价, 最终保证药物质量的安全稳定。

本实验拟采用灵敏度高、选择性强和稳定性好的超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) 技术^[14]在对 DTSC

中多种成分进行准确定量的同时, 并结合主成分分析 (PCA) 技术以从整体、全面的角度综合评价药物质量。该研究将为 DTSC 质控水平的提高提供科学的理论依据, 并为今后中药的现代化研究奠定一定的前期基础。

1 仪器与材料

UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 液质联用系统, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Acquity UPLC® BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 型色谱柱, 美国 Waters 公司; New Classic MS 型十万分之一分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 上海有限公司; MDS-6G 型多通量微波消解/萃取系统, 上海新仪微波化学科技有限公司; 多元数据处理软件 SIMCA14.0, 瑞典 Umetrics 公司。

对照品甜菜碱 (批号 MUST-17032105)、丹参素 (批号 MUST-15082714)、绿原酸 (批号 MUST-16031610)、原儿茶醛 (批号 MUST-15091608)、咖啡酸 (批号 MUST-15090803)、木犀草苷 (批号 MUST-16012405)、迷迭香酸 (批号 MUST-15082904)、丹酚酸 A (批号 MUST-16012810)、丹酚酸 B (批号 MUST-15081916)、槲皮素 (批号 MUST-16031804)、芹菜素 (批号 MUST-16061301)、二氢丹参酮 I (批号 MUST-17032705)、丹参酮 I (批号 MUST-

16030210)、隐丹参酮(批号 MUST-16022403)、丹参酮 II_A(批号 MUST-15092512)均购于成都曼思特生物科技有限公司;对照品葛根素(批号 wkq16080605)、洋川芎内脂 A(批号 wkq16050603)购于四川维克奇生物科技有限公司,以上对照品经峰面积归一化质量分数均大于 99%。甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,美国 Fisher 公司;水为超纯水,电导率为 0.1~0.055 μs/cm;其他试剂为分析纯,均购于天津科密欧化学试剂有限公司。DTSC 共 10 批次,分别为 1215030、1514061、1515005、1514043、1515012、1515013、1515014、1515015、1215052、1215055,云南施普瑞生物工程有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);以乙腈-0.1%甲酸水为流动相,梯度洗脱,洗脱程序为 0~0.5 min, 5%乙腈;0.5~1.5 min, 5%~40%乙腈;1.5~3.5 min, 40%~50%乙腈;3.5~5.5 min, 50%~70%乙腈;5.5~7.0 min, 70%~100%乙腈;7.0~10.0 min, 100%乙腈;体积流量为 0.2 mL/min;进样量为 5 μL;柱温为 40 ℃。

2.2 质谱条件

本实验离子源采用 HESI 源 (heated ESI),辅助气和离子传输管温度分别为 300、320 ℃,辅助气体积流量为 10 μL/min;正离子模式下:鞘气体积流量为 40 μL/min,喷雾电压为 3.50 kV;负离子模式下:鞘气体积流量为 38 μL/min,喷雾电压为 2.80 kV,本实验扫描方式采用正、负离子同时扫描的 Full MS/dd-MS2 模式,其中包括 1 次一级(分辨率为 70 000 FWHM)全扫描和 1 次数据依赖的(分辨率为 17 500 FWHM)二级扫描 2 个事件。*m/z* 扫描范围为 80~1 200,其他主要参数见表 1;在优化的色谱、质谱条件下,17 种待测成分的提取离子流图及质谱图见图 1。

2.3 混合对照品溶液的制备

取甜菜碱、丹参素、绿原酸、原儿茶醛、葛根素、咖啡酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、槲皮素、芹菜素、洋川芎内脂 A、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 对照品适量,精密称定,分别加入纯甲醇使制备成质量浓度为 1.0 mg/mL 的单一对照品储备液;分别精密量取上述对照品储备液适量,加入纯甲醇使最终制成质

表 1 17 种待测成分的质谱分析参数

Table 1 MS/MS parameters of 17 components

待测成分	化学式	模式	<i>t</i> /min	理论值 (<i>m/z</i>)	实测值 (<i>m/z</i>)	质量偏差 (×10 ⁻⁶)
甜菜碱	C ₅ H ₁₁ NO ₂	+	0.97	118.086 25	118.086 27	0.126
丹参素	C ₉ H ₁₀ O ₅	-	2.45	197.045 54	197.044 45	-5.566
绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-	2.98	353.087 80	353.087 07	-2.083
原儿茶醛	C ₇ H ₆ O ₃	-	3.02	137.024 41	137.022 90	-11.074
葛根素	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	-	3.02	415.103 45	415.102 69	-1.844
咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	-	3.12	179.034 98	179.033 69	-7.217
木犀草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	+	3.21	449.107 83	449.106 78	-2.355
迷迭香酸	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	-	3.40	359.077 24	359.076 69	-1.534
丹酚酸 A	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	-	3.51	493.114 02	493.113 19	-1.683
丹酚酸 B	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	-	3.61	717.146 10	717.144 59	-2.117
槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	-	3.68	301.035 37	301.034 58	-2.644
芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-	3.97	269.045 54	269.045 14	-1.512
洋川芎内脂 A	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	+	5.80	193.122 30	193.121 89	-2.156
二氢丹参酮 I	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	+	6.41	279.101 57	279.100 68	-3.192
丹参酮 I	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	+	7.26	277.085 92	277.085 05	-3.143
隐丹参酮	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	+	7.30	297.148 52	297.147 67	-2.864
丹参酮 II _A	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	+	7.96	295.132 87	295.131 99	-2.985

+—正离子模式 -—负离子模式

+—positive ion mode -—negative ion mode

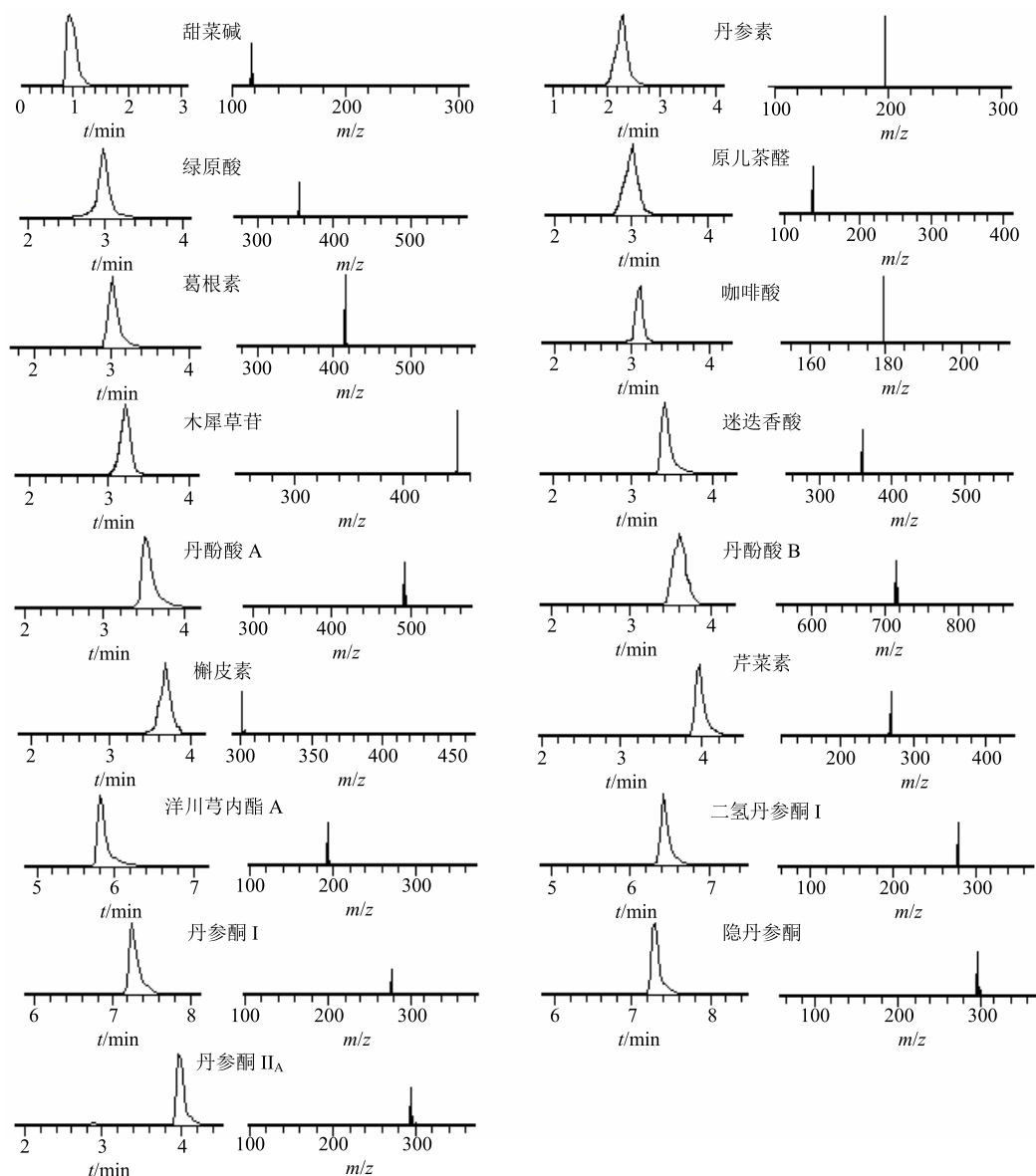


图 1 17 种待测成分的提取离子图和一级质谱图

Fig. 1 Extracting ion chromatograms and MS spectrum of 17 components

量浓度分别为甜菜碱 578.4 ng/mL、丹参素 177.782 0 $\mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 580.3 ng/mL、原儿茶醛 89.2 ng/mL、葛根素 25.191 3 $\mu\text{g/mL}$ 、咖啡酸 16.7 ng/mL、木犀草苷 228.9 ng/mL、迷迭香酸 2.105 3 $\mu\text{g/mL}$ 、丹酚酸 A 9.747 1 $\mu\text{g/mL}$ 、丹酚酸 B 124.417 6 $\mu\text{g/mL}$ 、槲皮素 16.0 ng/mL、芹菜素 18.1 $\mu\text{g/mL}$ 、洋川芎内脂 A 80.1 ng/mL、二氢丹参酮 I 632.8 ng/mL、丹参酮 I 1.031 7 $\mu\text{g/mL}$ 、隐丹参酮 3.290 0 $\mu\text{g/mL}$ 、丹参酮 II_A 1.422 9 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品储备液。

2.4 供试品溶液的制备

取本品内容物约 1.0 g，精密称定后置于容样杯中，精密加入 20 mL 纯甲醇，微波萃取(功率 600 W，温度 70 $^{\circ}\text{C}$ ，压力 70 MPa，时间 17 min)，取上层

溶液并经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取滤液，即得供试品溶液。

2.5 线性关系考察

分别精密量取混合对照品储备液适量，加入纯甲醇稀释后定容，依次配制成 6 个质量浓度的系列梯度混合对照品溶液，其中甜菜碱 18.1、36.1、72.3、144.6、289.2、578.4 ng/mL、丹参素 5.555 7、1.111 4、22.222 8、44.445 5、88.891 0、177.782 0 $\mu\text{g/mL}$ 、绿原酸 18.1、36.3、72.5、145.1、290.1、580.3 ng/mL、原儿茶醛 2.8、5.6、11.1、22.3、44.6、89.2 ng/mL、葛根素 0.787 2、1.574 5、3.148 9、6.297 8、12.595 7、25.191 3 $\mu\text{g/mL}$ 、咖啡酸 0.5、1.0、2.1、4.2、8.4、16.7 ng/mL、木犀草苷 7.2、14.3、28.6、57.2、114.5、

228.9 ng/mL、迷迭香酸 0.065 8、0.131 6、0.263 2、0.526 3、1.052 6、2.105 3 μg/mL、丹酚酸 A 0.304 6、0.609 2、1.218 4、2.436 8、4.873 5、9.747 1 μg/mL、丹酚酸 B 3.888 1、7.776 1、15.552 2、31.104 4、62.208 8、124.417 6 μg/mL、槲皮素 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 ng/mL、芹菜素 0.6、1.1、2.3、4.5、9.0、18.1 μg/mL、洋川芎内脂 A 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.1 ng/mL、二氢丹参酮 I 19.8、39.5、79.1、158.2、316.4、632.8 ng/mL、丹参酮 I 0.032 2、0.064 5、0.129 0、0.257 9、0.515 8、1.031 7 μg/mL、隐丹参酮

0.102 8、0.205 6、0.411 2、0.822 5、1.645 0、3.290 0 μg/mL、丹参酮 II_A 0.044 5、0.088 9、0.177 9、0.355 7、0.711 4、1.422 9 μg/mL。在优化的色谱、质谱条件下进样分析，记录提取峰面积，以各对照品的质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，计算回归方程、相关系数 (r) 及线性范围；以信噪比 (S/N) = 10 计算定量限 (LOQ)，结果见表 2。结果表明，17 种待测化合物在各自的质量浓度范围内线性关系均良好， r 均大于 0.999 2。

表 2 17 种成分的回归方程、相关系数、线性范围、LOQ

Table 2 Results of liner regression, correlation coefficient, liner range, and LOQ of 17 compounds

待测物	回归方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
甜菜碱	$Y=2.13 \times 10^9 X+3.39 \times 10^7$	0.999 2	0.018 1~0.578 4	0.037 1
丹参素	$Y=6.05 \times 10^6 X-1.07 \times 10^7$	0.999 4	5.555 7~177.782 0	6.693 6
绿原酸	$Y=3.29 \times 10^8 X-1.25 \times 10^6$	0.999 6	0.018 1~0.580 3	0.138 8
原儿茶醛	$Y=1.15 \times 10^9 X+3.23 \times 10^6$	0.999 8	0.002 8~0.089 2	0.096 4
葛根素	$Y=2.07 \times 10^8 X+6.20 \times 10^7$	0.999 5	0.787 2~25.191 3	0.157 1
咖啡酸	$Y=1.43 \times 10^6 X+4.55 \times 10^5$	0.999 6	0.000 5~0.016 7	0.029 7
木犀草苷	$Y=2.08 \times 10^8 X-4.56 \times 10^5$	0.999 6	0.007 2~0.228 9	0.011 4
迷迭香酸	$Y=4.17 \times 10^8 X-9.11 \times 10^6$	0.999 5	0.065 8~2.105 3	0.140 9
丹酚酸 A	$Y=1.22 \times 10^8 X+1.99 \times 10^6$	0.999 8	0.304 6~9.747 1	0.300 4
丹酚酸 B	$Y=2.83 \times 10^7 X-5.26 \times 10^7$	0.999 5	3.888 1~124.417 6	0.321 9
槲皮素	$Y=2.07 \times 10^6 X-5.06 \times 10^5$	0.999 4	0.000 5~0.016 0	0.022 7
芹菜素	$Y=5.77 \times 10^{10} X+1.42 \times 10^7$	0.999 2	0.000 6~0.018 1	0.015 4
洋川芎内脂 A	$Y=3.69 \times 10^9 X+1.06 \times 10^7$	0.999 3	0.002 5~0.080 1	0.041 2
二氢丹参酮 I	$Y=2.92 \times 10^9 X+3.84 \times 10^6$	0.999 8	0.019 8~0.632 8	0.011 0
丹参酮 I	$Y=2.41 \times 10^9 X+8.86 \times 10^6$	0.999 8	0.032 2~1.031 7	0.020 8
隐丹参酮	$Y=2.92 \times 10^9 X+3.84 \times 10^6$	0.999 7	0.102 8~3.290 0	0.023 0
丹参酮 II _A	$Y=3.69 \times 10^9 X+3.00 \times 10^7$	0.999 9	0.044 5~1.422 9	0.025 7

2.6 精密度考察

按“2.4”项下方法制备供试品溶液 (批号 1515005)，连续进样 6 次，结果显示甜菜碱、丹参素、绿原酸、原儿茶醛、葛根素、咖啡酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、槲皮素、芹菜素、洋川芎内脂 A、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 分别为 2.02%、3.45%、3.60%、1.45%、4.00%、2.90%、4.10%、2.68%、3.77%、3.06%、3.04%、3.13%、3.01%、4.86%、2.79%、4.61%、3.40%，结果表明该方法精密度良好。

2.7 重复性考察

取供试品溶液 (批号 1515005) 6 份，分别进样测定并计算质量分数，测得甜菜碱、丹参素、绿原

酸、原儿茶醛、葛根素、咖啡酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、槲皮素、芹菜素、洋川芎内脂 A、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 的平均质量浓度分别为 32.83、28 962.81、68.91、9.04、1 756.27、2.30、14.35、194.22、1 047.90、10 949.43、1.70、0.41、6.95、42.25、63.92、98.74、61.48 μg/g，RSD 分别为 3.40%、4.11%、2.44%、4.66%、4.11%、3.64%、2.73%、4.24%、2.35%、3.05%、2.42%、4.40%、3.28%、3.50%、4.00%、3.07%、2.69%，结果表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性考察

取供试品溶液 (批号 1515005)，分别于 0、2、6、10、12、24 h 进样分析，测得甜菜碱、丹参素、

绿原酸、原儿茶醛、葛根素、咖啡酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、槲皮素、芹菜素、洋川芎内脂 A、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 峰面积的 RSD 分别为 4.10%、1.94%、4.37%、4.31%、4.45%、3.86%、4.29%、2.60%、2.85%、3.29%、3.54%、3.72%、3.08%、3.21%、2.02%、3.92%、2.86%，结果表明，供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验

称取样品粉末 (批号 1515005) 共 9 等份，每 3 份为 1 组，精密称定，分别加入甜菜碱、丹参素、绿原酸、原儿茶醛、葛根素、咖啡酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、槲皮素、芹菜素、洋川芎内脂 A、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 对照品适量，使加入后各成分量分别为 DTSC 中相应成分量的 80%、100%、120%。按“2.4”项下方法平行制备供试品溶液，处理后分别进样测定。计算各待测物的平均回收率及 RSD，结果显示

甜菜碱、丹参素、绿原酸、原儿茶醛、葛根素、咖啡酸、木犀草苷、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、槲皮素、芹菜素、洋川芎内脂 A、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 的平均回收率分别为 98.00%、100.28%、99.44%、99.71%、98.06%、100.63%、98.88%、99.60%、101.33%、99.15%、101.73%、100.50%、100.10%、98.35%、99.28%、98.95%、100.21%，RSD 分别为 1.83%、2.54%、2.08%、2.43%、2.37%、2.48%、2.34%、2.19%、1.51%、2.19%、2.37%、2.54%、2.79%、1.71%、2.41%、2.18%、2.92%，结果表明该方法下 17 种待测成分的测定准确度较好。

2.10 样品测定

取 10 个不同批次的 DTSC，按“2.4”项下方法平行制备供试品溶液各 3 份，在“2.1”及“2.2”项下色谱和质谱条件进样分析，记录峰面积并计算 17 种待测物在 DTSC 中的含量，结果见表 3。

表 3 17 种待测成分的含量测定结果 ($n = 10$)

Table 3 Determination of 17 components ($n = 10$)

批号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)								
	甜菜碱	丹参素	绿原酸	原儿茶醛	葛根素	咖啡酸	木犀草苷	迷迭香酸	丹酚酸 A
1215030	32.99	28 374.97	54.73	11.28	1 609.03	3.26	16.69	273.01	1 283.98
1514061	30.13	22 590.75	70.22	5.08	3 296.67	2.83	28.72	172.31	828.77
1515005	32.97	28 526.36	65.45	8.83	1 686.26	2.21	14.07	189.89	1 026.80
1514043	21.73	18 381.73	34.75	3.81	1 290.85	2.20	18.30	174.29	908.59
1515012	26.16	11 994.79	61.22	2.94	1 715.46	2.71	38.48	190.35	537.76
1515013	23.72	10 084.98	56.75	2.05	1 605.67	2.86	31.28	166.98	447.59
1515014	27.85	12 004.90	60.51	2.43	1 842.42	3.03	30.89	196.22	552.82
1515015	24.99	10 010.66	51.55	1.99	1 700.00	2.35	15.91	169.03	394.32
1215052	26.48	11 442.67	59.00	2.43	1 738.38	2.93	38.54	191.12	521.34
1215055	18.91	8 709.94	36.86	2.46	1 535.23	1.90	8.22	157.91	370.80

批号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
	丹酚酸 B	槲皮素	芹菜素	洋川芎内脂 A	二氢丹参酮 I	丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 II _A
1215030	17 595.47	1.89	0.44	3.86	29.69	55.27	105.10	107.72
1514061	10 206.77	1.14	0.54	1.10	29.82	50.07	72.42	62.03
1515005	10 381.07	1.61	0.39	6.64	41.81	60.79	96.67	61.84
1514043	9 390.60	0.86	0.24	1.03	26.17	44.72	60.44	37.34
1515012	13 653.43	2.84	0.79	5.19	57.56	102.46	209.18	145.39
1515013	11 446.06	1.90	0.59	5.72	60.88	105.03	223.58	153.04
1515014	14 847.34	2.08	0.63	5.17	59.04	104.40	216.11	138.49
1515015	9 308.71	1.20	0.36	4.18	44.00	76.46	159.03	111.41
1215052	13 878.08	2.55	0.77	5.50	60.70	100.51	213.77	152.51
1215055	9 104.67	1.14	0.26	2.97	40.78	70.17	149.07	98.85

2.11 定量测定结果分析

将上述含量测定结果导入多元数据处理软件 SIMCA14.0, 并采用主成分分析法综合评价各批次药物的质量稳定性, 同时筛选出对药物质量差异起主要影响的成分。经主成分分析后, 得到样品批次的散点分布图和药物成分的载荷贡献图, 分别见图 2、3。

图 2 显示, 10 批次 DTSC 可明显分为 2 类, 其中批次 1215052、1515012、1515013、1515014 为第一类; 1515015、1215055、1514043、1514061、1515005、1215030 为第二类, 批次之间差异相对明显。为更加深入分析导致药物质量差异的主要原因, 本研究通过分析不同成分的载荷贡献图(图 3)发现, 丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 和丹参酮 II_A 4 种成分权重系数较大, 表明其对药物质量差异具有重要影响, 该结果提示生产企业以后在生产、检

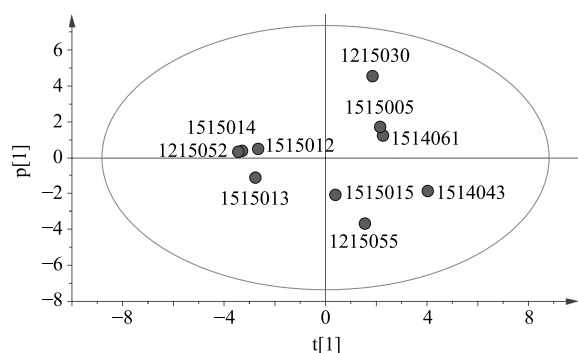
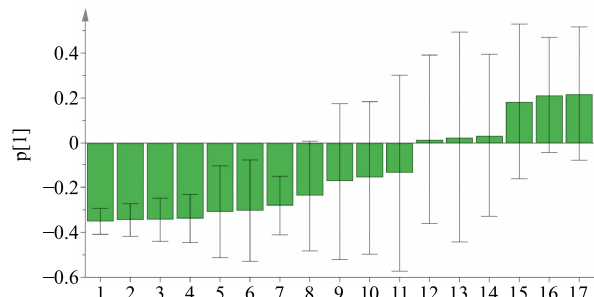


图 2 10 批药物的质量得分散点分布图

Fig. 2 Scatter plot of quality scores for ten batches of drug



1-丹参酮 I 2-隐丹参酮 3-二氢丹参酮 I 4-丹参酮 II_A 5-芹菜素
6-槲皮素 7-木犀草苷 8-洋川芎内脂 A 9-咖啡酸 10-丹酚酸 B
11-绿原酸 12-迷迭香酸 13-甜菜碱 14-葛根素 15-原儿茶醛
16-丹酚酸 A 17-丹参素
1-tanshinone I 2-cryptotanshinone 3-dihydrotanshinone I
4-tanshinon II_A 5-apigenin 6-puerarin 7-galuteolin
8-senkyunolide A 9-caffèic acid 10-salvianolic acid B
11-chlorogenic acid 12-rosmarinic acid 13-betaine 14-quercetin
15-protocatechuic aldehyde 16-salvianolic acid A 17-danshensu

图 3 药物中各成分的载荷贡献图

Fig. 3 Loading plot of various constituents in drugs

验过程中可重点关注以上 4 种成分的含量变化, 以更加快速、科学地实现中药质量控制, 最终保障药物的安全性和稳定性。

3 讨论

3.1 提取方法的选择

本实验重点考察了供试品分别在加热回流、超声提取和微波萃取条件下的提取效率, 以优化提取方法。结果表明, 本实验条件下, 加热回流耗时较长、耗能较多; 超声提取对药物中活性成分提取不够充分, 提取率较低; 而微波萃取耗时较短、溶剂用量较少、提取效率最高且绿色环保。经分析后, 发现微波萃取可定量控制能量传递, 直接向样品释放能量, 这种“内加热”方式可提高能量利用率, 减少损失, 最终显著提高提取效率, 因此, 本实验最终选择微波萃取作为实验前期样品制备的最佳提取方法。

3.2 色谱质谱条件的优化

本实验重点考察了甲醇-水、甲醇-甲酸水、乙腈-水和乙腈-甲酸水作为流动相系统时, 各色谱峰的分离效果。结果显示, 当采用甲醇作为有机相时, 色谱峰整体基线不平稳, 峰形较差, 分离度较低且拖尾严重; 而有机相使用乙腈时, 各色谱峰分离度较高, 基线波动较小, 峰形较好; 当在水相中加入 0.1% 的甲酸时, 各目标待测物峰形更佳, 质谱响应更好。因此, 本实验最终选择乙腈-0.1% 甲酸水作为流动相进行梯度洗脱。

此外, 本实验前期采用了正、负离子同时扫描模式对目标待测物的质谱响应进行初步探索, 以选择的最佳离子监测模式。结果显示, 各待测成分在不同的离子扫描模式下质谱响应具有明显的差异, 因此, 本实验按照各化合物在不同条件下的质谱响应结果并结合其各自的理化性质, 最终选择了最佳的离子扫描模式, 以使各目标化合物均具有最好的质谱响应, 确保能够满足准确、快速的定性定量要求。

DTSC 是我国传统药物中治疗高血压、冠心病等慢性病的常用代表性药物, 临床效果显著, 应用极为广泛, 但对于其较为系统的质量控制研究, 目前尚未见报道^[15-17]。因此, 为进一步提升和完善 DTSC 的质量控制标准, 确保临床用药安有效, 本研究采用先进的 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对药物中的多种组分进行定量分析, 并结合主成分分析法对其进行较为全面的质量评价研究。研究结果

表明, 10 批次的样品质量之间具有一定的差异性且主要分为两类; 经深入分析后发现, 丹参酮 I、隐丹参酮、二氢丹参酮 I 和丹参酮 II_A 对药物批次之间质量影响较大, 该结果提示生产企业以后在药物的生产和检验过程中可重点关注以上 4 种成分的含量变化, 以达到更加快速、科学地控制药物批次质量的目的。

本研究首次采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合主成分分析技术对 DTSC 不同批次质量进行了深入探索, 该分析思路及数据处理方法可以实现对今后不同产地、不同批次的中药进行较为系统、整体和全面的分析和评价, 可快速筛选出不同质量批次药物及需要重点关注的质量标志成分。实验结果表明, 该方法科学、可靠, 有力地补充了当前 DTSC 质量评价方法中的不足, 同时可为今后中药全面质量评价研究提供一定的参考依据和借鉴思路。

参考文献

- [1] 国家药品标准 (试行) [S]. 2011.
- [2] 国家中成药标准汇编: 经络肢体、脑系分册 [S]. 2002.
- [3] 冯桂丽. “丹灯通脑软胶囊”的临床应用 [J]. 中国实用医药, 2014, 9(4): 177.
- [4] 李 菲, 郑国成, 屈云萍, 等. 丹灯通脑胶囊剂的临床应用概况 [J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(13): 35-37.
- [5] Wang L, Zhou G B, Liu P, *et al.* Dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Realgar-Indigo naturalis as an effective treatment for promyelocytic leukemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(12): 4826-4831.
- [6] Capasso A, Sorrentino L. Pharmacological studies on the sedative and hypnotic effect of *Kava kava* and *Passiflora* extracts combination [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(1/2): 39-45.
- [7] Wargner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(2/3): 97-110.
- [8] 肖红斌, 刘艳秋, 王 莉, 等. 基于成分相互作用的中药复方组分配伍研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(2): 240-243.
- [9] 陈艳琰, 钱大玮, 尚尔鑫, 等. 基于化学成分相互作用探讨芫花与甘草配伍禁忌的机制 [J]. 药学学报, 2012, 47(8): 1043-1048.
- [10] 曾浩涛, 赵 淼, 陈地灵. 基于化学成分相互作用的槐花-地榆配伍 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 74-78.
- [11] 孙 志, 姜晓芳, 胡玉荣, 等. 基于 UPLC-MS/MS-模式识别技术的丹灯通脑软胶囊中多种活性成分定量研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1126-1132.
- [12] 邱 颖. RP-HPLC 法测定丹灯通脑软胶囊中葛根素和阿魏酸的含量 [J]. 安徽医药, 2013, 17(2): 212-213.
- [13] 陈 莉, 叶 鹏. 高效液相色谱法测定丹灯通脑软胶囊中葛根素含量 [J]. 医药导报, 2008, 27(4): 463-464.
- [14] 刘 俊, 朱宝平, 孙 志, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱的妇可靖胶囊中 11 种成分定量研究 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 353-359.
- [15] 幸宇坚. 丹灯通脑软胶囊治疗高血压病 86 例疗效观察 [J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(1): 97-98.
- [16] 张时东. 丹灯通脑软胶囊治疗急性脑梗死的疗效观察 [J]. 首都医药, 2014, 21(8): 47-48.
- [17] 王 艳, 黄 萍. 丹灯通脑软胶囊治疗糖尿病足溃疡的临床观察 [J]. 实用糖尿病杂志, 2010, 6(1): 49-50.