

UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合主成分分析的复方血栓通胶囊质量评价研究

李 宁

郑州大学附属肿瘤医院, 河南省肿瘤医院 药学部, 河南 郑州 450008

摘要:目的 建立基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 的复方血栓通胶囊中多种活性成分定量分析方法, 并采用主成分分析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 (A)-0.1% 甲酸水 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 以实现化合物的前期分离; 通过 Q-Orbitrap MS 先进的正、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; 最后将定量结果与主成分分析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、琥珀酸、丹参素钠、丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、芦丁、人参皂苷 Rg₁、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、汉黄芩素、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 I、人参皂苷 Rg₃、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 和齐墩果酸分别在 0.009 8~0.314 5、0.067 8~2.170 7、0.044 2~1.413 3、0.059 6~1.907 2、0.003 3~0.104 4、0.002 8~0.089 9、0.001 2~0.038 3、0.006 3~0.203 2、0.960 5~30.735 5、0.022 2~0.709 0、0.083 7~2.679 5、0.593 8~19.002 6、0.000 2~0.005 3、0.012 3~0.394 4、0.004 5~0.143 5、0.009 2~0.293 4、0.066 0~2.113 3、0.033 0~1.055 0、0.004 5~0.145 5、0.015 9~0.508 1、0.024 1~0.772 0、0.009 3~0.297 8、0.002 5~0.078 8 μg/mL 线性关系良好 ($r \geq 0.999 0$); 精密度、重复性及稳定性良好 (RSD ≤ 5%); 加样回收率在 98%~101%, 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, 其中人参皂苷 Rg₁、丹酚酸 B、琥珀酸、丹酚酸 A、丹参素和丹参素钠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, 可用于复方血栓通胶囊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; 复方血栓通胶囊; 主成分分析; 质量评价; 甜菜碱; 琥珀酸; 丹参素钠; 丹参素; 原儿茶酸; 原儿茶醛; 咖啡酸; 芦丁; 人参皂苷 Rg₁; 迷迭香酸; 丹酚酸 A; 丹酚酸 B; 汉黄芩素; 毛蕊异黄酮; 芒柄花黄素; 黄芪皂苷 II; 黄芪皂苷 I; 人参皂苷 Rg₃; 二氢丹参酮 I; 丹参酮 I; 隐丹参酮; 丹参酮 II_A; 齐墩果酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)19-4552-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.19.013

Quality assessment study of Compound Xueshuantong Capsules based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with principal component analysis

LI Ning

Department of Pharmacy, Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis method of multiple active components in Compound Xueshuantong Capsules (CXC) based on ultra performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS), and make 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 (A)-water (B) (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 realize the accurate qualification and quantitation; Using the quantitative results combined with the principal component analysis to achieve the scientific assessment of the drug in different batches. **Results** Under the optimized conditions, betaine, succinic acid, salviatic acid A sodium, danshensu, protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde, caffeic acid, rutin, ginsenoside Rg₁, rosmarinic acid, salviolic acid A, salviolic acid B, wogonin, calycosin, formononetin, astragaloside II, astragaloside I, ginsenoside Rg₃, dihydrotanshinone I, tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone II_A, and oleanic acid all showed good liner relationship ($r \geq 0.999 0$)

收稿日期: 2018-04-23

作者简介: 李 宁, 男, 副主任药师, 研究方向为中药质量控制。Tel: (0371)65587016 E-mail: lining7621@126.com

in the range of 0.009 8—0.314 5, 0.067 8—2.170 7, 0.044 2—1.413 3, 0.059 6—1.907 2, 0.003 3—0.104 4, 0.002 8—0.089 9, 0.001 2—0.038 3, 0.006 3—0.203 2, 0.960 5—30.735 5, 0.022 2—0.709 0, 0.083 7—2.679 5, 0.593 8—19.002 6, 0.000 2—0.005 3, 0.012 3—0.394 4, 0.004 5—0.143 5, 0.009 2—0.293 4, 0.066 0—2.113 3, 0.033 0—1.055 0, 0.004 5—0.145 5, 0.015 9—0.508 1, 0.024 1—0.772 0, 0.009 3—0.297 8, 0.002 5—0.078 8 $\mu\text{g/mL}$, respectively; The results of the accuracy, repeatability, and stability all reached the standards ($\text{RSD} \leq 5\%$); The recoveries ranged from 98%—101% and RSDs were all below 3%; the analysis results showed that the quality of the most batches was stable, the ginsenoside Rg_1 , salvianolic acid B, succinic acid, salvianolic acid A, danshensu, and salvianic acid A sodium had a great influence on the quality of the medicine, which could be specially monitored to ensure the quality of different batches of the medicine. **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 CXC. The research also provides a new scientific basis and reference for the quality assessment at the same time.

Key words: UPLC-Q-Orbitrap HRMS; Compound Xueshuantong Capsules; principal component analysis; quality assessment; betaine; succinic acid; salvianic acid A sodium; danshensu; protocatechuate; protocatechuic aldehyde; caffeic acid; rutin; ginsenoside Rg_1 ; rosmarinic acid; salvianolic acid A; salvianolic acid B; wogonin; calycosin; formononetin; astragaloside II; astragaloside I; ginsenoside Rg_3 ; dihydrotanshinone I; tanshinone I; cryptotanshinone; tanshinone II_A ; oleanic acid

复方血栓通胶囊 (Compound Xueshuantong Capsule, CXC) 是由三七、玄参、丹参和黄芪共 4 味中药材, 经现代工艺提取加工、精制而成的中药复方制剂, 目前收载于《中国药典》2015 年版一部^[1]。该药具有活血化瘀、益气养阴之功效, 临床上主要用于治疗稳定型心绞痛以及视网膜静脉阻塞等疾病的治疗, 临床疗效确切, 应用广泛^[2-6]。CXC 是在传统中医药理论的指导下由各味药材配伍而成的中药制剂, 其主要是通过药物中不同活性成分群之间的相互协同作用, 从而达到多成分、多靶点和多层次的综合治疗效果, 最终发挥增效减毒的目的^[7-8]。然而, 中药化学成分复杂, 《中国药典》2015 年版及相关研究仅对该药中丹酚酸 B 等个别成分的含量做了相应规定, 难以较为科学、全面地反映中药质量, 且这些方法大多是基于传统的 HPLC 法建立的, 存在灵敏度低, 准确性差等方面的不足^[9-11]。同时, 如何从中药海量复杂数据中提取出有效信息, 并从整体、系统的角度综合评价药物质量, 最终找到能够反映中药质量差异的标志物已经成为当代中药研究的热点^[12-13]。因此, 当前亟需建立一种灵敏度高、准确性好的快速分析方法并结合先进的数据提取技术, 以期能够更加科学、全面地控制 CXC 的药物质量, 最终保证药物临床使用的安全、有效。

本研究将采用先进的超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (ultra performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap HRMS)^[14]并结合主成分分析方法^[15], 在对中药中多种化学成分准确定量的同时, 能够更加系统、全面地评价药物

质量。该方法具有灵敏度高、准确性好和科学性强等显著优点, 可完全用于 CXC 中复杂化学成分的定量分析及药物质量评价研究。该研究可为今后进一步提高中药复方制剂的质控水平提供一种较好的借鉴思路, 同时为中药质量的现代化研究奠定科学基础。

1 仪器与材料

UPLC-Q-Orbitrap HRMS 液质联用系统, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Acquity UPLC[®] BEH C_{18} (50 mm \times 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 SIMCA 14.0, 瑞典 Umetrics 公司。

对照品甜菜碱 (批号 MUST-17032105)、琥珀酸 (批号 MUST-17030502)、丹参素钠 (批号 MUST-16030206)、丹参素 (批号 MUST-15082714)、原儿茶酸 (批号 MUST-16032112)、原儿茶醛 (批号 MUST-15091608)、咖啡酸 (批号 MUST-15090803)、芦丁 (批号 MUST-16031812)、人参皂苷 Rg_1 (批号 MUST-17021414)、迷迭香酸 (批号 MUST-15082904)、丹酚酸 A (批号 MUST-16012810)、丹酚酸 B (批号 MUST-15081916)、汉黄芩素 (批号 MUST-17110603)、毛蕊异黄酮 (批号 MUST-17120901)、芒柄花黄素 (批号 MUST-17031005)、黄芪皂苷 II (批号 MUST-17031008)、黄芪皂苷 I (批号 MUST-17032906)、人参皂苷 Rg_3 (批号 MUST-17030711)、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)、齐墩果酸 (批号 MUST-16070406) 均购于成都曼思特生物科技有限公司, 以上对照品经峰面积归一化法测得质量分数均大于 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 $\mu\text{S}/\text{cm}$; 其他试剂为分析纯, 均购于天津科密欧化学试剂有限公司。CXC 共 10 批, 批号分别为 150410、150411、151012、151129、151203、160203、160208、160302、160414、160417, 广东众生药业股份有限公司。

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%甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 洗脱程序为 0~0.5 min, 5%乙腈; 0.5~1.0 min, 5%~35%乙腈; 1.0~3.5 min, 35%~

50%乙腈; 3.5~5.5 min, 50%~70%乙腈; 5.5~7.0 min, 70%~100%乙腈; 7.0~10 min, 100%乙腈; 体积流量为 0.2 mL/min; 进样量为 5 μL ; 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

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 $^{\circ}\text{C}$, 辅助气体积流量为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$; 正离子模式: 鞘气体积流量为 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, 喷雾电压为 3.50 kV; 负离子模式: 鞘气体积流量为 38 $\mu\text{L}/\text{min}$, 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。扫描范围为 m/z 80~1 200, 其他主要参数见表 1。在优化的色谱、质谱条件下, 23 种待测成分的提取离子流图及质谱图见图 1。

表 1 23 种待测成分的质谱分析参数

Table 1 MS/MS parameters of 23 components

待测物	化学式	t/min	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)
甜菜碱	C ₅ H ₁₁ NO ₂	0.90	118.086 25	118.086 29	0.295
琥珀酸	C ₄ H ₆ O ₄	1.41	117.019 33	117.017 86	-12.579
丹参素钠	C ₉ H ₉ O ₅ Na	2.42	219.027 49	219.026 60	-4.070
丹参素	C ₉ H ₁₀ O ₅	2.45	197.045 54	197.044 59	-4.855
原儿茶酸	C ₇ H ₆ O ₄	2.63	153.019 33	153.017 99	-8.770
原儿茶醛	C ₇ H ₆ O ₃	2.89	137.024 41	137.023 07	-9.833
咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	2.92	179.034 98	179.033 94	-5.820
芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	2.96	609.146 10	609.145 26	-1.392
人参皂苷 Rg ₁	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	3.11	823.481 42	823.478 88	-0.309
迷迭香酸	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	3.16	359.077 24	359.076 51	-2.035
丹酚酸 A	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	3.27	493.114 02	493.113 34	-1.379
丹酚酸 B	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	3.45	717.146 10	717.144 53	-2.200
汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	3.52	283.061 19	283.060 73	-1.649
毛蕊异黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	3.54	285.075 75	285.075 16	-2.070
芒柄花黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	4.47	267.066 28	267.065 80	-1.805
黄芪皂苷 II	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	4.74	849.460 69	849.458 19	-2.946
黄芪皂苷 I	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	5.70	869.489 31	869.486 82	-2.867
人参皂苷 Rg ₃	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	6.11	807.486 51	807.483 89	-3.249
二氢丹参酮 I	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	6.43	279.101 57	279.100 77	-2.869
丹参酮 I	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	7.26	277.085 92	277.085 08	-3.034
隐丹参酮	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	7.30	297.148 52	297.147 71	-2.729
丹参酮 II _A	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	7.97	295.132 87	295.132 11	-2.578
齐墩果酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	8.63	455.353 06	455.352 08	-2.171

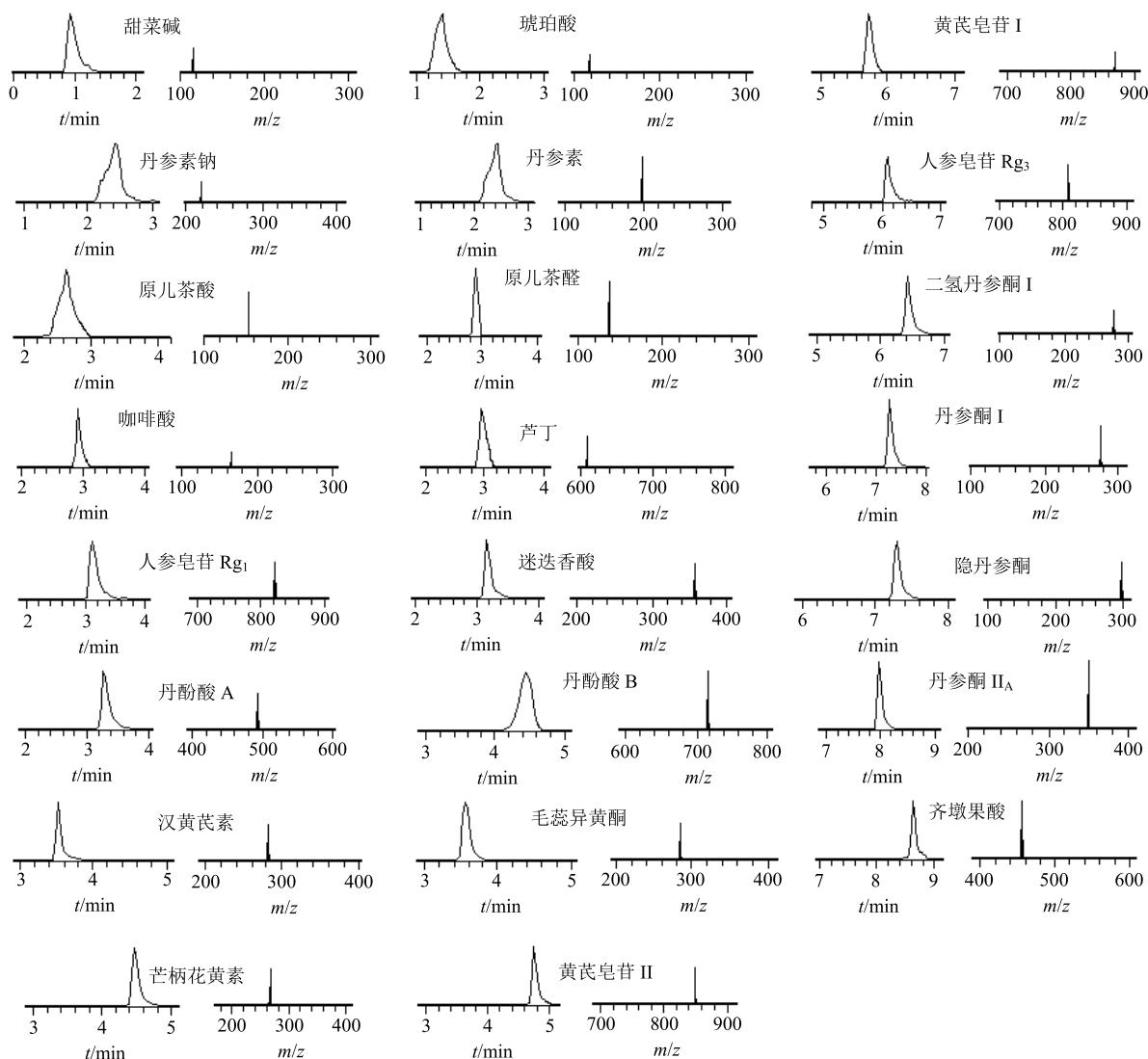


图 1 23 种待测成分的提取离子图和一级质谱图

Fig. 1 Extracting ion chromatograms and MS of 23 components

2.3 混合对照品溶液的制备

取甜菜碱、琥珀酸、丹参素钠、丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、芦丁、人参皂苷 Rg₁、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、汉黄芩素、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 I、人参皂苷 Rg₃、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A、齐墩果酸对照品适量，精密称定，分别加入纯甲醇制成质量浓度为 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量浓度分别为甜菜碱 0.314 5 μg/mL、琥珀酸 2.170 7 μg/mL、丹参素钠 1.413 3 μg/mL、丹参素 1.907 2 μg/mL、原儿茶酸 0.104 4 μg/mL、原儿茶醛 0.089 9 μg/mL、咖啡酸 0.038 3 μg/mL、芦丁 0.203 2 μg/mL、人参皂苷 Rg₁

30.735 5 μg/mL、迷迭香酸 0.709 0 μg/mL、丹酚酸 A 2.679 5 μg/mL、丹酚酸 B 19.002 6 μg/mL、汉黄芩素 0.005 3 μg/mL、毛蕊异黄酮 0.394 4 μg/mL、芒柄花黄素 0.143 5 μg/mL、黄芪皂苷 II 0.293 4 μg/mL、黄芪皂苷 I 2.113 3 μg/mL、人参皂苷 Rg₃ 1.055 0 μg/mL、二氢丹参酮 I 0.145 5 μg/mL、丹参酮 I 0.508 1 μg/mL、隐丹参酮 0.772 0 μg/mL、丹参酮 II_A 0.297 8 μg/mL、齐墩果酸 0.078 8 μg/mL 的混合对照品储备液。

2.4 供试品溶液的制备

取本品 3 粒，去壳后取内容物精密称定 1.0 g，置于容样杯中，精密加入 50 mL 纯甲醇，微波萃取（功率 600 W；温度 70 °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溶液, 其中甜菜碱 0.009 8、0.019 7、0.039 3、0.078 6、0.157 2、0.314 5 $\mu\text{g/mL}$ 、琥珀酸 0.067 8、0.135 7、0.271 3、0.542 7、1.085 4、2.170 7 $\mu\text{g/mL}$ 、丹参素钠 0.044 2、0.088 3、0.176 7、0.353 3、0.706 6、1.413 3 $\mu\text{g/mL}$ 、丹参素 0.059 6、0.119 2、0.238 4、0.476 8、0.953 6、1.907 2 $\mu\text{g/mL}$ 、原儿茶酸 0.003 3、0.006 5、0.013 1、0.026 1、0.052 2、0.104 4 $\mu\text{g/mL}$ 、原儿茶醛 0.002 8、0.005 6、0.011 2、0.022 5、0.045 0、0.089 9 $\mu\text{g/mL}$ 、咖啡酸 0.001 2、0.002 4、0.004 8、0.009 6、0.019 1、0.038 3 $\mu\text{g/mL}$ 、芦丁 0.006 3、0.012 7、0.025 4、0.050 8、0.101 6、0.203 2 $\mu\text{g/mL}$ 、人参皂苷 Rg_1 0.960 5、1.921 0、3.841 9、7.683 9、15.367 8、30.735 5 $\mu\text{g/mL}$ 、迷迭香酸 0.022 2、0.044 3、0.088 6、0.177 2、0.354 5、0.709 0 $\mu\text{g/mL}$ 、丹酚酸 A 0.083 7、0.167 5、0.334 9、0.669 9、1.339 8、2.679 5 $\mu\text{g/mL}$ 、丹酚酸 B 0.593 8、1.187 7、2.375 3、4.750 7、9.501 3、19.002 6 $\mu\text{g/mL}$ 、汉黄芩素 0.000 2、0.000 3、0.000 7、0.001 3、0.002 6、0.005 3 $\mu\text{g/mL}$ 、毛蕊异黄酮 0.012 3、0.024 7、0.049 3、0.098 6、0.197 2、0.394 4 $\mu\text{g/mL}$ 、芒柄花黄素 0.004 5、0.009 0、0.017 9、0.035 9、0.071 7、0.143 5 $\mu\text{g/mL}$ 、黄芪皂苷 II 0.009 2、0.018 3、0.036 7、0.0733、0.146 7、0.293 4 $\mu\text{g/mL}$ 、黄芪皂苷 I 0.066 0、0.132 1、0.264 2、0.528 3、1.056 6、2.113 3 $\mu\text{g/mL}$ 、人参皂苷 Rg_3 0.033 0、0.065 9、0.131 9、0.263 8、0.527 5、1.055 0 $\mu\text{g/mL}$ 、二氢丹参酮 I 0.004 5、0.009 1、0.018 2、0.036 4、0.072 7、0.145 5 $\mu\text{g/mL}$ 、丹参酮 I 0.015 9、0.031 8、0.063 5、0.127 0、0.254 1、0.508 1 $\mu\text{g/mL}$ 、隐丹参酮 0.024 1、0.048 2、0.096 5、0.193 0、0.386 0、0.772 0 $\mu\text{g/mL}$ 、丹参酮 II_A 0.009 3、0.018 6、0.037 2、0.074 5、0.148 9、0.297 8 $\mu\text{g/mL}$ 、齐墩果酸 0.002 5、0.004 9、0.009 9、0.019 7、0.039 4、0.078 8 $\mu\text{g/mL}$ 。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, 23 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 0。

2.6 精密度考察

按“2.4”项下方法制备供试品溶液 (批号 150410), 连续进样 6 次, 结果显示甜菜碱、琥珀酸、丹参素钠、丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、芦丁、人参皂苷 Rg_1 、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、汉黄芩素、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 I、人参皂苷 Rg_3 、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 、齐墩果酸峰面积的 RSD 分别为 3.46%、3.87%、1.93%、3.76%、3.68%、2.39%、3.14%、3.96%、3.49%、3.31%、2.44%、4.62%、4.88%、3.27%、2.77%、4.42%、3.49%、3.91%、4.05%、3.76%、2.99%、2.59%、0.88%, 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 6 份 (批号 150410), 分别进样测定并计算质量分数, 测得甜菜碱、琥珀酸、丹参素钠、丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、芦丁、人参皂苷 Rg_1 、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、汉黄芩素、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 I、人参皂苷 Rg_3 、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 、齐墩果酸的平均质量浓度分别为 35.70、137.85、109.26、141.87、14.37、18.71、2.43、3.85、2 966.96、89.17、277.83、752.29、9.45、17.73、8.10、51.43、331.34、157.17、15.80、37.60、50.97、40.08、4.95 $\mu\text{g/mL}$, RSD 分别为 4.94%、4.15%、3.12%、3.40%、2.29%、2.33%、0.67%、4.01%、4.76%、4.21%、3.33%、3.21%、3.46%、3.67%、3.85%、4.59%、4.16%、4.13%、2.78%、3.00%、4.39%、2.82%、4.09%, 结果表明该方法的重复性良好。

2.8 稳定性试验

取供试品溶液 (批号 150410), 分别于 0、2、6、10、12、24 h 进样分析, 测得甜菜碱、琥珀酸、丹参素钠、丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、芦丁、人参皂苷 Rg_1 、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、汉黄芩素、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 I、人参皂苷 Rg_3 、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A 、齐墩果酸峰面积的 RSD 分别为 3.54%、2.64%、2.71%、4.60%、4.70%、4.45%、3.31%、3.13%、2.34%、3.84%、3.21%、1.96%、4.27%、4.06%、3.18%、4.60%、4.91%、2.49%、3.60%、1.03%、4.86%、3.01%、1.58%, 结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

表 2 23 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 23 compounds

成分	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
甜菜碱	$Y=2.51 \times 10^{10} X+1.01 \times 10^8$	0.999 8	0.009 8~0.314 5	0.000 37
琥珀酸	$Y=5.29 \times 10^8 X+1.80 \times 10^7$	0.999 4	0.067 8~2.170 7	0.049 56
丹参素钠	$Y=4.86 \times 10^7 X-1.25 \times 10^6$	0.999 0	0.044 2~1.413 3	0.139 70
丹参素	$Y=7.03 \times 10^8 X-1.89 \times 10^7$	0.999 5	0.059 6~1.907 2	0.070 01
原儿茶酸	$Y=2.58 \times 10^9 X+6.07 \times 10^6$	0.999 1	0.003 3~0.104 4	0.000 92
原儿茶醛	$Y=1.14 \times 10^{10} X+3.98 \times 10^7$	0.999 3	0.002 8~0.089 9	0.002 24
咖啡酸	$Y=1.37 \times 10^{10} X+6.56 \times 10^6$	0.999 0	0.001 2~0.038 3	0.000 17
芦丁	$Y=9.84 \times 10^8 X-4.20 \times 10^5$	0.999 6	0.006 3~0.203 2	0.000 96
人参皂苷 R _{g1}	$Y=3.08 \times 10^8 X+2.84 \times 10^8$	0.999 3	0.960 5~30.735 5	0.000 45
迷迭香酸	$Y=4.65 \times 10^9 X-1.73 \times 10^7$	0.999 4	0.022 2~0.709 0	0.000 04
丹酚酸 A	$Y=2.13 \times 10^9 X+3.11 \times 10^7$	0.999 5	0.083 7~2.679 5	0.001 41
丹酚酸 B	$Y=2.45 \times 10^8 X+5.20 \times 10^7$	0.999 1	0.593 8~19.002 6	0.072 06
汉黄芩素	$Y=8.77 \times 10^{11} X+8.40 \times 10^7$	0.999 1	0.000 2~0.005 3	0.000 02
毛蕊异黄酮	$Y=1.16 \times 10^{10} X-5.23 \times 10^7$	0.999 7	0.012 3~0.394 4	0.000 04
芒柄花黄素	$Y=2.64 \times 10^{10} X+4.06 \times 10^6$	0.999 6	0.004 5~0.143 5	0.000 05
黄芪皂苷 II	$Y=8.08 \times 10^8 X+2.55 \times 10^6$	0.999 6	0.009 2~0.293 4	0.013 94
黄芪皂苷 I	$Y=5.67 \times 10^7 X-2.56 \times 10^6$	0.999 4	0.066 0~2.113 3	0.049 08
人参皂苷 R _{g3}	$Y=3.08 \times 10^8 X+3.73 \times 10^6$	0.999 6	0.033 0~1.055 0	0.010 50
二氢丹参酮 I	$Y=2.23 \times 10^{10} X+3.40 \times 10^7$	0.999 1	0.004 5~0.145 5	0.000 18
丹参酮 I	$Y=1.11 \times 10^{10} X+5.19 \times 10^7$	0.999 7	0.015 9~0.508 1	0.000 28
隐丹参酮	$Y=1.39 \times 10^{10} X+2.92 \times 10^7$	1.000 0	0.024 1~0.772 0	0.000 31
丹参酮 II _A	$Y=3.29 \times 10^{10} X+1.15 \times 10^8$	0.999 5	0.009 3~0.297 8	0.000 39
齐墩果酸	$Y=2.44 \times 10^9 X-2.58 \times 10^6$	0.999 6	0.002 5~0.078 8	0.000 97

2.9 加样回收率试验

称取样品粉末(批号 150410)共 9 等份,每 3 份为 1 组,精密称定,分别加入甜菜碱、琥珀酸、丹参素钠、丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、芦丁、人参皂苷 R_{g1}、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、汉黄芩素、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 I、人参皂苷 R_{g3}、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A、齐墩果酸对照品适量,使加入各分量分别为 CXC 中相应成分量的 50%、100%、150%。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、琥珀酸、丹参素钠、丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、芦丁、人参皂苷 R_{g1}、迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B、汉黄芩素、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 I、人参皂苷 R_{g3}、二氢丹参酮 I、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A、齐墩果酸的平均

回收率分别为 100.06%、98.74%、100.52%、100.67%、99.30%、99.81%、99.47%、100.20%、100.87%、99.08%、98.69%、99.11%、99.37%、98.45%、99.70%、100.03%、100.48%、100.64%、99.64%、100.62%、99.86%、100.69%、99.75%,RSD 分别为 2.49%、2.50%、3.00%、2.90%、2.71%、2.95%、2.42%、2.17%、2.66%、2.43%、2.45%、2.57%、2.52%、1.82%、2.65%、2.23%、2.50%、2.11%、2.24%、2.12%、2.04%、2.15%、2.37%,结果表明该方法下 23 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 CXC 样品,按“2.4”项下方法平行制备供试品溶液各 3 份,在优化的色谱、质谱条件下进样分析,记录峰面积并计算 23 种待测物在 CXC 中的含量,结果见表 3。

2.11 主成分分析及药物质量评价

主成分分析可对复杂海量信息中的多维变量进

表 3 23 种待测成分的含量测定结果 (n = 10)
Table 3 Determination of 23 components (n = 10)

批号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
	甜菜碱	琥珀酸	丹参素钠	丹参素	原儿茶酸	原儿茶醛	咖啡酸	芦丁
150410	14.88	229.55	257.80	294.09	11.94	16.21	1.39	5.24
150411	14.25	305.88	236.35	262.08	14.15	15.38	1.45	6.53
151012	14.74	244.50	221.70	265.74	10.22	8.46	1.36	4.23
151129	11.66	227.47	134.53	155.69	12.65	4.28	1.31	3.69
151203	16.12	271.92	238.99	275.10	7.47	9.33	1.32	6.02
160203	23.78	335.92	173.02	209.02	11.10	6.84	2.02	5.65
160208	23.51	262.02	262.75	294.66	15.77	8.32	1.76	6.18
160302	20.76	348.45	251.34	298.28	8.77	4.47	1.77	5.50
160414	21.93	293.64	250.81	263.11	8.91	6.44	1.73	6.21
160417	18.04	249.47	195.56	223.76	8.23	8.71	1.94	7.76

批号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
	人参皂苷 R _{g1}	迷迭香酸	丹酚酸 A	丹酚酸 B	汉黄芩素	毛蕊异黄酮	芒柄花黄素	黄芪皂苷 II
150410	2 788.54	0.79	111.43	2 713.68	0.09	13.23	4.71	27.39
150411	2 967.82	0.76	93.81	2 633.78	0.02	5.13	1.83	17.84
151012	2 924.97	0.76	118.46	2 125.16	0.21	26.71	8.75	29.08
151129	2 578.37	0.74	63.48	1 740.94	0.07	9.96	4.29	19.58
151203	2 754.42	0.76	117.45	2 634.17	0.13	16.33	7.11	17.58
160203	3 198.53	0.75	74.08	2 174.14	0.25	30.47	9.62	36.82
160208	2 931.81	0.76	106.54	1 896.76	0.08	12.61	5.63	21.62
160302	3 228.52	0.76	90.39	1 933.15	0.12	15.89	6.80	35.23
160414	3 291.80	0.78	80.56	1 871.15	0.13	16.99	7.46	26.81
160417	1 410.25	0.77	32.69	2 050.58	0.03	5.95	2.43	31.14

批号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)						
	黄芪皂苷 I	人参皂苷 R _{g3}	二氢丹参酮 I	丹参酮 I	隐丹参酮	丹参酮 II _A	齐墩果酸
150410	167.30	80.67	13.05	43.53	101.90	43.39	3.28
150411	101.32	87.00	14.85	43.29	110.52	53.74	2.93
151012	154.47	72.00	11.42	31.89	74.27	32.25	4.88
151129	121.76	66.65	12.25	33.52	92.74	37.95	3.46
151203	150.38	148.59	18.43	50.73	138.83	62.27	4.23
160203	226.79	75.34	15.92	46.89	96.70	49.99	6.86
160208	167.76	69.92	9.46	32.05	54.00	29.81	4.84
160302	182.31	87.62	10.60	35.33	59.04	35.20	5.00
160414	140.47	85.29	9.03	25.01	49.61	29.79	4.77
160417	215.97	73.62	17.50	51.08	97.40	51.70	6.86

行快速提取、重新组合、数学降维，并生成新的综合变量即主成分，经投影处理后，样本最终落在主成分组成平面上的位置，即可表征不同样本的总体信息。该数据提取分析方法原理与中药多成分的天然属性高度一致，因此，特别适用于中药综合质量

的评价分析。本实验将上述含量测定结果导入多元数据处理软件 SIMCA 14.0，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。经主成分分析处理后，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, 大部分批次药物分布较为集中, 表明大多数药物质量较为稳定; 同时, 图中 160417 批次药物与其他批次相比距离较远, 属于样本离群值, 质量相对不稳定。为更加深入分析导致药物质量差异的主要原因, 本实验重点考察了各成分的载荷权重值, 载荷值即表示各成分对整个批次药物散点分布的贡献大小, 载荷值的绝对值越大则表明其对药物批次质量影响较大。

本研究通过分析不同成分的载荷贡献图(图 3)发现, 人参皂苷 Rg_1 、丹酚酸 B、琥珀酸、丹酚酸 A、丹参素和丹参素钠共 6 种成分在图中距离原点最远, 表明其对药物质量差异具有重要影响。

图 2 与图 3 结合进行分析, 发现 160417 批次药物在第 1 主成分上与其他批次之间呈明显的分离趋势, 且位于第 1 主成分轴的负半轴; 而对药物质量具有影响的 6 种成分全部位于第 1 权重载荷轴的正半轴, 与 160417 批次位置相反, 表明这些成分在该批次的散点分布的贡献权重系数为负值; 同时结合表中含量测定结果发现, 与其他批次相比较, 这 6 种成分在 160417 批次中的含量明显低于平均水平, 因此, 对该批次的贡献权重系数为负值, 最终导致该批次质量差异较为明显。该结果提示生产企业以

后在生产、检验过程中可重点关注以上 6 种成分的含量变化, 以更加快速、科学地实现中药质量控制, 最终保障药物的质量安全性和稳定性。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

本实验重点考察了甲醇-水、甲醇-甲酸水和乙腈-甲酸水作为色谱流动相系统时, 各色谱峰的分离效果, 以选择最合适的流动相类型。实验结果显示, 当使用乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱时, 分离效果最佳, 基线较稳, 保留时间适中, 峰形最好, 适用于本研究中中药中各复杂化合物的前期充分分离。

3.2 质谱条件的选择

本实验采用了先进的一级全扫描结合数据依赖性二级扫描(Full MS/ddms²)方法以实现对待测物的精准定性和定量, 该方法共包括 2 个事件, 首先是对样品中复杂成分进行一级全扫描, 其次是对指定的目标母离子进行二级 MS 碎片离子扫描。

此外, 虽然质谱的高分辨率使其具有更好的选择性和更高的质量精度, 但当分辨率过高(如分辨率为 140 000)时, 却容易导致质谱灵敏度的显著下降, 因此, 合适的分辨率对于高分辨质谱能够准确快速定性、定量具有至关重要的作用。本实验分别考察了各化合物在 17 500、35 000、70 000 及 140 000 分辨率条件下质谱信号的响应强度, 最终选择 70 000 作为一级质谱的最佳扫描分辨率; 当进行二级质谱扫描时发现, 较高的分辨率可明显降低质谱的扫描速度, 同时造成一级扫描点数的不足, 导致色谱峰形较差, 从而严重影响定量结果的准确性, 因此, 本实验最终选择 17 500 作为二级质谱的最佳扫描分辨率。

中药是通过药物中各有效成分的有机组合、相互作用而产生综合治疗效果的, 其本身具有多成分、多靶点、多层次的药物特点, 最终实现从系统和整体的层面治疗复杂疾病^[16-17]。CXC 中的各味组成药材, 如三七中的人参皂苷具有免疫调节作用; 黄芪中的黄芪皂苷具有镇痛抗炎、强心降压等作用; 丹参中的丹参素具有抗心肌缺血、保护心肌细胞的作用; 玄参中的琥珀酸具有抗炎抑菌等作用^[18-20], 药物中的各种化学成分相互配合、互相协同, 共同发挥 CXC 活血化瘀、益气养阴的治疗功效。因此, 中药质控体系的建立须基于药物中多个有效成分的同时监测并对其进行综合评价, 以使药物的质量稳

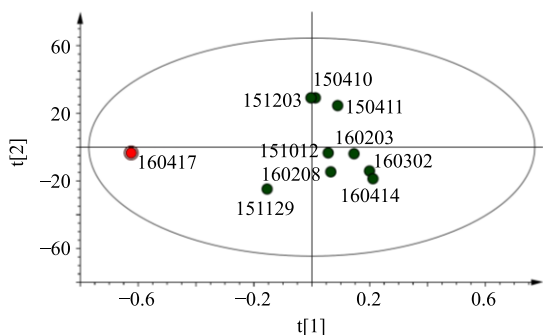


图 2 10 批药物的质量得分散点分布图

Fig. 2 Scatter plot of quality scores for 10 batches of drug

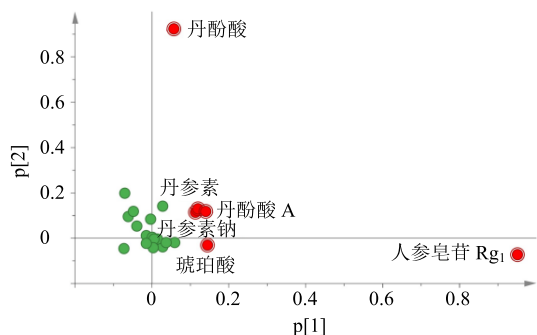


图 3 药物中各成分的载荷贡献图

Fig. 3 Loading plot of various constituents in drugs

定性更好, 最终保证中药临床使用的安全、有效。本实验采用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术建立的中药复杂成分分析及质控方法操作简单、选择性高、专属性强且定量结果准确性好, 该方法在一定程度上能有效提高 CXC 的质量控制水平, 为市售 CXC 的质量评价提供参考依据, 同时为中药的现代化发展奠定一定的基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 薛恩忠, 景月月. 复方血栓通胶囊联合氯沙坦治疗高血压的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(10): 1217-1220.
- [3] 汪剑飞, 张亚中. 复方血栓通胶囊质量控制研究进展 [J]. 北方药学, 2015, 12(11): 86-87.
- [4] 赵小英. 复方血栓通胶囊在眼科疾病中的应用 [J]. 大家健康: 学术版, 2015, 9(20): 155.
- [5] 吴华锋, 蔡雪桃, 孔肖樱, 等. 复方血栓通胶囊治疗稳定性心绞痛的临床观察 [J]. 亚太传统医药, 2012, 8(3): 79-80.
- [6] 宋志刚. 复方血栓通胶囊联合神经节苷脂治疗面神经炎的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(9): 1668-1671.
- [7] 周霖, 李卓伦, 牛超, 等. 基于超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术的妇可靖胶囊化学成分研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(8): 813-821.
- [8] 刘俊, 朱宝平, 孙志, 等. 基于超高效液相色谱-四级杆/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.
- [9] 成彦, 陈伟. HPLC 法同时测定复方血栓通胶囊中 5 种皂苷类成分 [J]. 安徽医药, 2015, 19(7): 1264-1267.
- [10] 丛竹凤, 高鹏. HPLC 测定复方血栓通胶囊中人参皂苷 R_{g1} R_{b1} 和三七皂苷 R₁ 的含量 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(3): 509-511.
- [11] 王玉华, 付丽佳, 徐莲琴, 等. HPLC-ELSD 测定复方血栓通胶囊中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1} 及 R_{b1} 的含量 [J]. 中医药信息, 2014, 31(2): 70-72.
- [12] 张铁军, 王杰, 陈常青, 等. 基于中药属性和作用特点的中药质量标志物研究与质量评价路径 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1051-1060.
- [13] 左莉华, 胡玉荣, 周霖, 等. UPLC-MS/MS 法测定冠心舒通胶囊中多种活性成分的含量及药物质量评价 [J]. 沈阳药科大学学报, 2018, 35(2): 103-110.
- [14] 刘俊, 朱宝平, 孙志, 等. 基于超高效液相色谱-四级杆/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] 罗益远, 刘娟秀, 王锋, 等. 基于 UPLC-Triple TOF-MS/MS 技术分析何首乌代谢物积累的动态变化 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2105-2110.
- [16] 王忠, 陈寅莹, 张盈颖, 等. 多组分多靶点中药药理作用机制研究中的问题和解决策略 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5): 1-6.
- [17] 杜冠华, 王月华, 张冉, 等. 多成分多靶点是对中药作用机制的表面认识 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(4): 480-484.
- [18] 朱晓丽. 人参皂苷药理作用研究进展 [J]. 中国药物经济学, 2017, 12(12): 152-154.
- [19] 郭宪清, 张丽香, 姜秉荣. 黄芪皂苷类组分的现代药理研究进展 [J]. 中国药业, 2006, 15(12): 66-67.
- [20] 龚博, 朱彦, 樊官伟. 丹参素心血管药理作用研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2015, 34(3): 188-192.