

UPLC-MS/MS 多组分快速测定结合化学模式识别的玉叶清火片质量控制研究

覃华亮, 覃子龙*, 符传武, 谢金利

柳州市食品药品检验所, 广西 柳州 545001

摘要: **目的** 建立 UPLC-MS/MS 法同时测定玉叶清火片中 10 种指标成分(京尼平苷酸、绿原酸、山梔苷甲酯、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、梔子苷、玉叶金花苷酸甲酯、 β -蜕皮甾酮、穿心莲内酯、蟛蜞菊内酯、脱水穿心莲内酯)的含量, 结合化学模式识别方法对其进行系统、全面和科学的质量评价。**方法** 安捷伦 Zorbax SB C₁₈ 柱(50 mm×3.0 mm, 1.8 μ m); 流动相为甲醇-0.1%乙酸(含 0.02 mol/L 乙酸铵)水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min; 质谱采用 ESI 正、负离子同时采集, 多反应监测(MRM)模式扫描, 并对定量测定结果进行聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA), 综合评价其质量的差异性。**结果** 在优化的色谱质谱条件下, 10 种成分分别在 0.352 5~14.100 0、5.402~270.100、0.205 8~8.232 0、1.050~42.020、4.020~160.800、4.328~173.100、2.044~204.400、2.251~225.000、0.232 8~9.312 0、4.708~188.300 μ g/mL 线性关系良好($r>0.999\ 1$), 平均加样回收率 95.02%~99.66% (RSD<3.0%); 定量分析结果表明大多数批次药物质量较为稳定; 但通过 CA 和 PCA 均发现不同批次药品质量之间仍然存在微小差异, 最后通过 OPLS-DA 筛出引起批次间质量差异的 6 个标志性成分, 分别是穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、玉叶金花苷酸甲酯、山梔苷甲酯、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、绿原酸。**结论** 实验建立的方法简便、灵敏、高效, 可用于玉叶清火片中多种主要活性成分的快速测定; 测定结果结合化学模式识别技术可从整体上综合评价药物质量, 为玉叶清火片的质量控制研究提供新的科学依据和数据处理方法。

关键词: 玉叶清火片; UPLC-MS/MS; 化学模式识别; 质量控制; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 京尼平苷酸; 绿原酸; 山梔苷甲酯; 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸; 梔子苷; 玉叶金花苷酸甲酯; β -蜕皮甾酮; 穿心莲内酯; 蟛蜞菊内酯; 脱水穿心莲内酯

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)22-5470-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.013

Quality control research of Yuye Qinghuo Tablets by UPLC MS/MS multicomponent determination coupled with chemical pattern recognition

QIN Hua-liang, QIN Zi-long, FU Chuan-wu, XIE Jin-li

Liuzhou Institute for Food and Drug Control, Liuzhou 545001, China

Abstract: **Objective** To establish the UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 10 active components (geniposidic acid, chlorogenic acid, shanzhiside methyl ester, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, geniposide, mussaenoside, β -ecdysone, andrographolide, wedelolactone, and dehydroandrographolide) in Yuye Qinghuo Tablets (YQT), in order to make a systemic, comprehensive, and scientific quality evaluation of the drug combined with the chemical pattern recognition method. **Methods** The chromatographic separation was achieved on Agilent Zorbax SB C₁₈ (50 mm × 3.0 mm, 1.8 μ m); The mobile phase was consisted of methanol-0.1% acetic acid (containing 20 mmol/L ammonium acetate) at a flow rate of 0.3 mL/min with gradient elution, the mass spectrum was scanned by ESI⁺ and ESI⁻ multiple reaction monitoring (MRM) mode. And the content analysis was carried out by cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) to comprehensively evaluate the difference in quality of YQT. **Results** Under the optimized conditions, 10 components showed good linear relationships in the ranges of 0.352 5—14.100 0, 5.402—270.100, 0.205 8—8.232 0, 1.050—42.020, 4.020—160.800, 4.328—

收稿日期: 2019-05-05

基金项目: 柳州市科技攻关项目(2018B0501a011)

作者简介: 覃华亮(1981—), 男, 主管中药师, 主要研究方向为中药质量控制研究。E-mail: 23033415@qq.com

*通信作者 覃子龙(1984—), 男, 主管药师, 主要研究方向为中药质量控制研究。E-mail: 125490357@qq.com

173.100, 2.044—204.400, 2.251—225.000, 0.232 8—9.312 0, and 4.708—188.300 $\mu\text{g/mL}$, respectively ($r > 0.999$ 1), whose average recoveries were 95.02%—99.66% ($\text{RSD} < 3.0\%$). The analysis results showed that the quality of the most batches was stable. However, it was found that there were still slight differences in the quality of different batches of drugs by CA and PCA. Finally, six symbolic components causing the quality differences among batches were screened out by OPLS-DA, they were andrographolide, dehydroandrographolide, mussaenoside, shanzhiside methyl ester, 3,5-*O*-dicafeoylquinic acid, and chlorogenic acid, respectively.

Conclusion This simple, sensitive, and efficient method can be used for the rapid determination of main active components in YQT. The analysis of results combined with the chemical pattern recognition technology can comprehensively evaluate the drug quality as a whole, which provide new scientific basis and data processing methods for the quality control research of YQT.

Key words: Yuye Qinghuo Tablets; UPLC-MS/MS; chemical pattern recognition; quality control; CA; PCA; OPLS-DA; geniposidic acid; chlorogenic acid; shanzhiside methyl ester; 3,5-*O*-dicafeoylquinic acid; geniposide; mussaenoside; β -ecdysone; andrographolide; wedelolactone; dehydroandrographolide

玉叶清火片 (Yuye Qinghuo Tablets, YQT) 是以传统壮医药为理论依据, 由玉叶金花、穿心莲、梔子、墨旱莲、倒扣草 5 味中药制备而成, 主要功效为清热解毒、消肿止痛, 临床常用于喉痹、暴暗、急性咽喉炎以及其他风热证者。其中玉叶金花的活性成分主要为环烯醚萜苷和咖啡酰基奎宁酸类成分, 如山梔苷甲酯、玉叶金花苷酸甲酯、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸, 具有良好的抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒等作用^[1]; 穿心莲的主要活性成分是二萜内酯类, 如穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯, 具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒、降糖、保肝等药理活性^[2]; 梔子的主要活性成分为环烯醚萜类、有机酸酯类等, 如梔子苷、京尼平苷酸、绿原酸, 具有抗炎、利胆保肝、降压、降血糖等作用^[3]; 旱墨莲的主要活性成分有黄酮类、三萜皂苷类及香豆素醚类等, 如蟛蜞菊内酯, 具有抗炎、抗骨质疏松、抗氧化、抗肿瘤等作用^[4-7]; 倒扣草的活性成分为三萜甾酮类, 如蜕皮甾酮, 具有抗炎、保肝、调血脂、抑制血糖等作用^[8-9]。

目前, 有文献报道以梔子苷、穿心莲内酯及脱水穿心莲内酯为指标成分, 采用 HPLC 法对 YQT 进行定量测定的分析方法^[10-12], 但无法实现对各组方药材指标成分的含量测定, 质量控制不全面, 且分析周期长。本实验采用 UPLC-MS/MS 法同时对各组方药材中主要活性物质的 10 种代表性指标成分 (京尼平苷酸、绿原酸、山梔苷甲酯、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、梔子苷、玉叶金花苷酸甲酯、 β -蜕皮甾酮、穿心莲内酯、蟛蜞菊内酯、脱水穿心莲内酯) 进行快速测定, 并结合聚类分析 (CA)、主成分分析 (PCA) 及正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 等模式识别方法^[13-22], 寻找引起不同批次间药物质量差异的标志性成分, 为药企投料提

供合理建议, 以期 YQT 的质量控制提供科学依据和新思路。

1 仪器与试剂

Shimadzu LC-30AD 超高效液相色谱仪, 配置 Triple Quad 4500 三重四级杆质谱仪, 美国 AB Sciex 公司; Mettler Xp26 百万分之一天平, 瑞士梅特勒公司; AS7240BT 超声波清洗器, 天津奥特赛恩斯仪器有限公司。

对照品脱水穿心莲内酯 (A1, 批号 110854-201710, 质量分数 99.4%)、穿心莲内酯 (A2, 批号 110797-201609, 质量分数 99.7%)、梔子苷 (A3, 批号 110749-201115, 质量分数 99.7%)、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 (A4, 批号 111782-201706, 质量分数 97.3%)、绿原酸 (A5, 批号 110753-201716, 质量分数 99.3%)、京尼平苷酸 (A6, 批号 111828-201102, 质量分数 96.0%) 购自中国食品药品检验研究院, 玉叶金花苷酸甲酯 (A7, 批号 CF201702, 质量分数 98%) 购自上海远慕生物科技有限公司, 蟛蜞菊内酯 (A8, 批号 18122022, 质量分数 97.0%)、 β -蜕皮甾酮 (A9, 批号 18071722, 质量分数 98.0%)、山梔苷甲酯 (A10, 批号 18121941, 质量分数 98.0%) 购自上海同田生物技术股份有限公司。甲醇、乙腈, 色谱纯, 欧姆尼科技有限公司。水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。YQT 共 10 个批次, 广西纯正堂制药有限公司, 批号分别为 896014、896019、897004、897005、897008、898003、898008、898010、898011、898012, 分别编号为 S1~S10。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为安捷伦 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (50 mm $\times$ 3.0 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1% 乙酸 (含 0.02 mol/L 乙酸铵) 水溶液-甲醇, 梯度洗脱程序: 0~3 min,

10%甲醇; 3~5 min, 10%~80%甲醇; 5~7 min, 80%甲醇; 7~9 min, 80%~10%甲醇; 9~12 min, 10%甲醇; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 1 μL。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源 (ESI); 离子化电压 ±4.5 kV; 离子源温度 550 ℃; 气帘气压力 172.369 kPa (25 psi); 喷雾气压力 379.212 kPa (55 psi); 辅助加热气压力 379.212 kPa (55 psi); 碰撞气为氮气; 扫描模式为多反应监测模式 (MRM)。具体参数见

表 1, 各成分的提取离子流色谱图见图 1。

2.3 混合对照品溶液的制备

精密称取山梔苷甲酯、玉叶金花苷酸甲酯、穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、梔子苷、蟛蜞菊内酯、β-蜕皮甾酮、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、绿原酸、京尼平苷酸对照品适量, 分别置于容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成各对照品储备液。精密量取上述各储备液适量, 加甲醇稀释至刻度摇匀, 即得含山梔苷甲酯 8.232 μg/mL、玉叶金花苷酸甲酯 1.731 μg/mL、穿心莲内酯 2.250 μg/mL、脱水

表 1 各成分质谱参数

Table 1 MS parameters of various constituents

成分	<i>t_R</i> /min	离子模式	离子对 (<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
京尼平苷酸	3.22	[M-H] ⁻	373.1/123.1	-85	-26
绿原酸	3.57	[M-H] ⁻	353.1/191.0	-55	-25
山梔苷甲酯	5.29	[M-H] ⁻	405.1/242.9	-75	-18
3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	5.40	[M-H] ⁻	515.2/353.0	-70	-22
梔子苷	5.47	[M-H] ⁻	387.0/225.1	-50	-16
玉叶金花苷酸甲酯	5.52	[M+H] ⁺	407.8/229.1	80	20
β-蜕皮甾酮	5.81	[M+H] ⁺	481.2/445.3	115	21
穿心莲内酯	6.04	[M+H] ⁺	351.3/297.3	80	12
蟛蜞菊内酯	6.13	[M+H] ⁺	315.0/287.0	120	35
脱水穿心莲内酯	6.37	[M-H] ⁻	331.2/239.1	-70	-40

穿心莲内酯 1.883 μg/mL、梔子苷 1.608 μg/mL、蟛蜞菊内酯 9.312 μg/mL、β-蜕皮甾酮 2.044 μg/mL、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 0.4202 μg/mL、绿原酸 2.701 μg/mL、京尼平苷酸 0.1410 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取 YQT 20 片, 除去包衣, 研细。精密称取细粉 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 超声 30 min, 放冷, 用甲醇补足减失质量, 摇匀, 紧密吸取上清液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.5 检出限和定量限

精密量取“2.3”项下的混合对照品溶液 1.0 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度摇匀, 按“2.1”和“2.2”项下条件进样分析, 记录色谱图, 同时不断稀释已知质量浓度的对照品溶液, 以信噪比为 3:1 和 10:1 分别计算检出限和定量限, 结果见表 2。

2.6 线性关系考察

将对照品储备液用甲醇逐级稀释, 配制成不同质量浓度的混合对照品工作溶液, 在“2.1”和“2.2”项下条件测定, 以质量浓度为横坐标 (*X*), 峰面积为纵坐标 (*Y*) 进行线性回归。结果表明, 10 种成分在相应的范围内线性关系良好, 见表 2。

2.7 精密度考察

取批号为 896019 的样品, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 测得各成分峰面积 RSD 分别为京尼平苷酸 1.3%、绿原酸 1.9%、山梔苷甲酯 1.1%、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 1.6%、梔子苷 1.3%、玉叶金花苷酸甲酯 1.7%、β-蜕皮甾酮 2.4%、穿心莲内酯 1.5%、蟛蜞菊内酯 2.5%、脱水穿心莲内酯 0.8%, 表明该方法有较好的精密度。

2.8 稳定性考察

取批号为 896019 的样品, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 按“2.1”和“2.2”项下条件测定, 记录色谱图, 测得

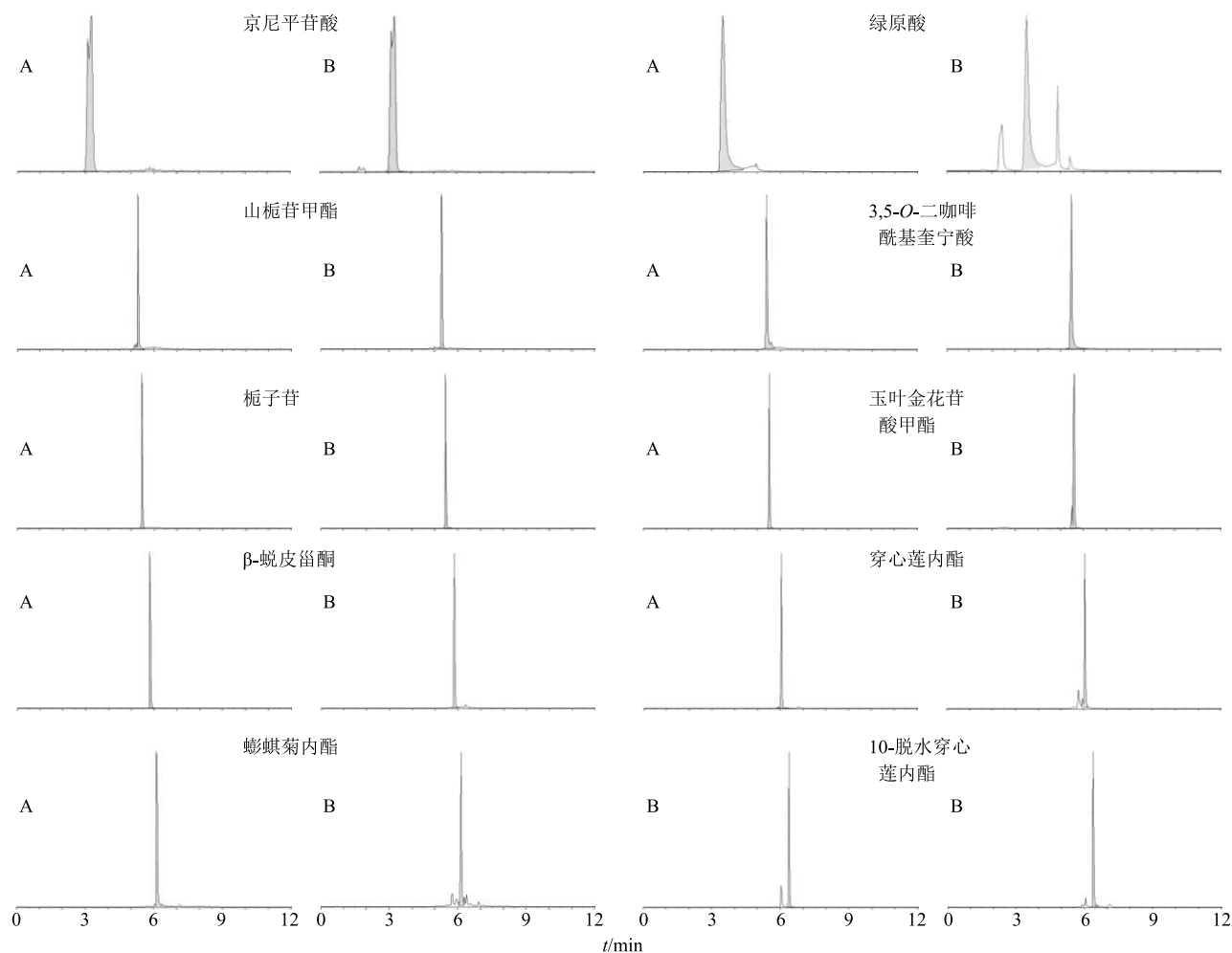


图 1 对照品 (A) 和 YQT 样品 (B) 中各成分的提取离子流色谱图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of analytes

表 2 各成分线性关系、检测限和定量限

Table 2 Linear relationships, LODs, and LOQs of various constituents

成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r	检出限/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
蟛蜞菊内酯	$Y=388\,997\,X-0.476\,5$	0.232 8~9.312 0	0.999 7	0.75	2.50
脱水穿心莲内酯	$Y=35\,761\,X-39.000\,1$	4.708~188.300	0.999 3	25.00	83.01
穿心莲内酯	$Y=10\,537\,X-3.076\,8$	2.251~225.000	0.999 8	3.50	12.00
玉叶金花苷酸甲酯	$Y=214\,323\,X-232.79$	4.328~173.100	0.999 3	2.70	9.00
β-蜕皮甾酮	$Y=367\,351\,X-504\,961$	2.044~204.400	0.999 4	1.70	5.60
山梔苷甲酯	$Y=115\,928\,X-0.057\,3$	0.205 8~8.232 0	0.999 7	1.20	4.00
3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸	$Y=218\,976\,X+89\,995$	1.050~42.020	0.999 9	0.93	3.10
梔子苷	$Y=36\,385\,X-0.082\,9$	4.020~160.800	0.999 6	4.60	15.00
绿原酸	$Y=862\,609\,X+988.57$	5.402~270.100	0.999 8	0.49	1.60
京尼平苷酸	$Y=166\,604\,X-0.057\,3$	0.352 5~14.100 0	0.999 1	3.10	10.00

各成分峰面积 RSD 分别为京尼平苷酸 1.7%、绿原酸 1.8%、山梔苷甲酯 2.1%、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸 2.6%、梔子苷 1.3%、玉叶金花苷酸甲酯 0.9%、

β-蜕皮甾酮 2.2%、穿心莲内酯 1.1%、蟛蜞菊内酯 3.7%、脱水穿心莲内酯 1.5%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.9 重复性考察

取批号为 896019 的样品,按“2.4”项下方法制备供试品溶液 6 份,按“2.1”和“2.2”项下条件测定,记录色谱图,测得各成分含量 RSD 分别为京尼平苷酸 0.9%、绿原酸 2.0%、山梔苷甲酯 1.2%、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 3.2%、梔子苷 1.6%、玉叶金花苷酸甲酯 2.8%、 β -蜕皮甾酮 4.1%、穿心莲内酯 2.4%、蟛蜞菊内酯 3.7%、脱水穿心莲内酯 1.1%。表明该方法的重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的样品(896019)20 片,除去包衣,研细,精密称取 6 份,每份 0.25 g,分别置锥形瓶中,分别加入低、中、高 3 种质量浓度的对照品储

备溶液适量,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,进样 1 μ L 测定,计算加样回收率,结果京尼平苷酸、绿原酸、山梔苷甲酯、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、梔子苷、玉叶金花苷酸甲酯、 β -蜕皮甾酮、穿心莲内酯、蟛蜞菊内酯、脱水穿心莲内酯的平均加样回收率分别为 97.94%、96.46%、99.66%、96.92%、98.32%、95.54%、97.60%、97.00%、95.02%、98.06%,RSD 分别为 2.18%、1.34%、2.61%、1.11%、1.19%、1.47%、2.74%、1.74%、1.21%、2.29%。

2.11 样品含量测定

精密称取 10 个不同批次 YQT,每批 2 份,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”和“2.2”项条件下进样测定,计算含量,结果见表 3。

表 3 YQT 样品中 10 种成分的测定结果 ($n=2$)

Table 3 Content of 10 constituents in YQT ($n=2$)

批号	含量/(μ g $\cdot$ 片 $^{-1}$)									
	京尼平 苷酸	绿原酸	山梔苷 甲酯	3,5- <i>O</i> -二咖啡 酰基奎宁酸	梔子苷	玉叶金花 苷酸甲酯	β -蜕皮 甾酮	穿心莲 内酯	蟛蜞菊 内酯	脱水穿心 莲内酯
896014	14.762	93.124	65.452	202.872	1 284.197	91.032	17.942	152.045	4.136	955.046
896019	14.267	152.774	54.363	279.886	1 529.227	129.889	8.001	276.973	2.058	1 104.177
897004	11.338	120.835	52.497	234.641	1 315.745	127.436	7.489	293.638	2.198	1 147.385
897005	14.532	153.342	77.585	293.414	1 714.339	140.341	8.328	352.628	1.846	1 084.823
897008	15.299	174.714	121.830	330.903	1 717.194	117.328	9.524	432.006	7.397	1 089.721
898003	91.296	128.047	114.760	272.147	1 391.228	139.439	10.711	295.392	1.800	1 118.782
898008	29.198	163.243	106.650	295.763	1 723.376	95.821	9.146	622.737	2.185	1 285.636
898010	26.392	261.395	108.870	313.719	1 572.715	96.032	9.469	697.312	7.651	1 268.732
898011	74.574	181.133	105.130	335.672	1 654.348	94.809	9.195	617.856	2.271	1 355.726
898012	26.316	140.527	107.770	273.322	1 898.211	96.946	8.732	638.634	0.942	1 231.349

2.12 CA

将 10 批样品 3 次平行实验测得的 10 个成分含量作为变量,导入 SPSS 19.0 数据分析软件中,采用系统聚类法中离差平方和法(Ward 法),选取平方 Euclidean 距离作为样品测度,对不同批次之间的样品进行 CA,绘出树状图,在距离 15 内,可将 10 批样品分为 2 大类,见图 2。S5(897008)、S7(898008)、S8(898010)、S9(898011)、S10(898012)聚为第 1 类,S1(896014)、S2(896019)、S3(897004)、S4(897005)、S6(898003)聚为第 2 类。直观分析这 2 类药品的生产时间,可以发现第 1 类药物生产年份主要集中在 2018 年,第 2 类主要集中在 2017 年和 2016 年,说明在相近时间生产的样品各成分含量较接近,分析其主要原因,有可能与不同时间的

生产工艺、质量控制体系以及投料药材质量的差异有关。

2.13 PCA

为了从整体上分析 YQT 不同批次之间的质量稳定性,本实验采用多元数据处理软件 Simca 14.0 对不同批次之间数据进行 PCA,如图 3,显示 10 批药品的质量偏差均控制在 2 SD(standard deviation,标准偏差)左右,表明批次之间差异较小,总体质量较为稳定;但批次 S1(896014)、S7(898008)、S9(898011)的质量偏差在 1 SD~2 SD,较其他批次稍有差异,通过载荷图(图 4)分析导致质量差异的主要因素,可知 A2(穿心莲内酯)对批次的质量偏差贡献最大,其次是 A1(脱水穿心莲内酯)、A4(3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸)、A5(绿原

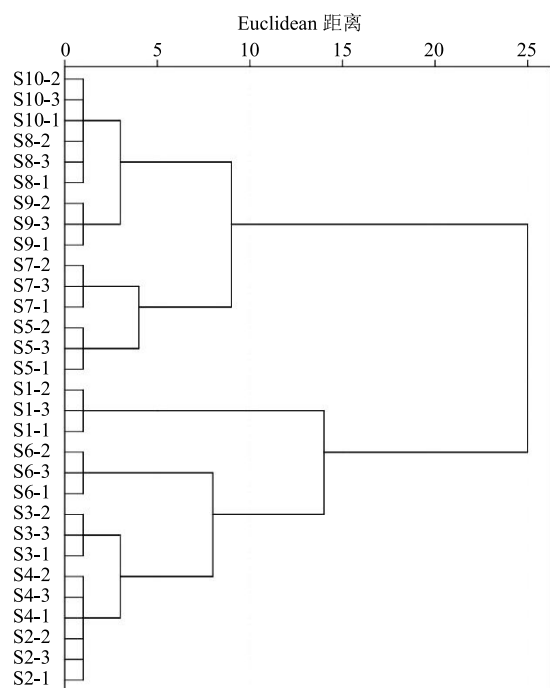


图 2 10 批 YQT 聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of 10 batches of YQT

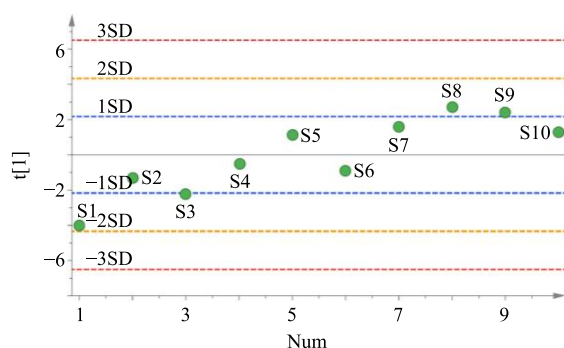


图 3 10 批 YQT 样品的 PCA 散点得分图

Fig. 3 PCA scatter plot of 10 batches of YQT

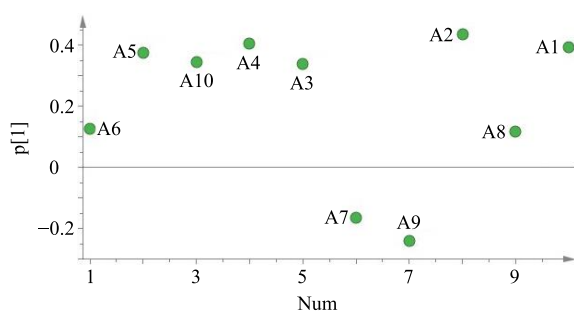


图 4 10 种活性成分载荷图

Fig. 4 Loading plot of 10 active components

酸)、A10 (山梔苷甲酯), A3 (梔子苷), 提示在生产中可对这些化学成分进行重点控制, 以减少药物批次之间的质量差异。

此外, 从图 3 来看, 10 批样品可分为 2 大类,

第 1 类为 S5 (897008)、S7 (898008)、S8 (898010)、S9 (898011)、S10 (898012)、第 2 类为 S1 (896014)、S2 (896019)、S3 (897004)、S4 (897005)、S6 (898003), 结果和上述聚类分析一致。

2.14 OPLS-DA

为了更好地分析上述不同类别样本之间的差异, 本研究采用有监督的 OPLS-DA 模型进行建模分析, 得分图见图 5。由模型验证参数可知, 数据矩阵的解释率参数 $R^2_x=0.628$, 模型区分参数 $R^2_y=0.948$, 模型预测参数 $Q^2=0.837$, 均大于 0.5, 表明建立的数学模型稳定且预测能力较强。同时, 结合变量重要性投影值 (VIP) 筛选出能引起不同批次 YQT 成分差异的主要标志性成分, 以 VIP 大小 >1 的成分确定为贡献较大的成分。由图 6 可知 $VIP>1$ 的成分有 6 个, 按照大小依次为 A2、A7、A4、A1、A5、A10, 该结果与 PCA 中载荷图寻找的重要性权重变量大体一致, 表明以上化合物是不同批次之间产生差异的主要标志性成分, 对不同批次样品分布起主要作用, 因此生产企业要提高 YQT 质量的一致性, 在实际生产中需要对上述 6 种成分的含量进行重点控制, 以减少药品批次之间的质量差异。

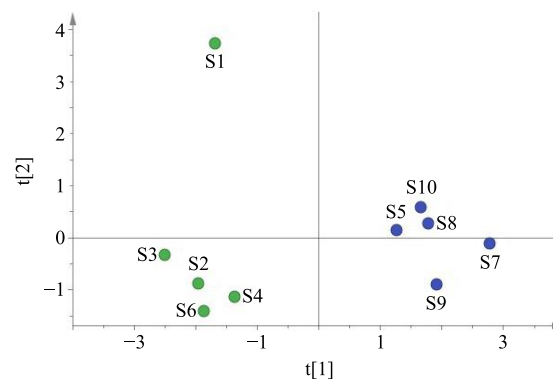


图 5 10 批 YQT 样品的 OPLS-DA 散点得分图

Fig. 5 OPLS-DA scatter plot of 10 batches of YQT

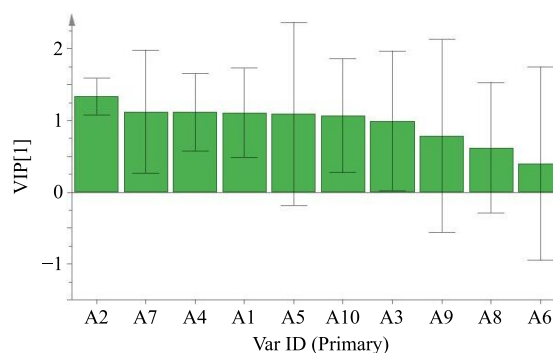


图 6 10 种活性成分的 VIP 图

Fig. 6 VIP plot of 10 active components

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

根据相关文献报道^[1], 实验中分别考察了甲醇-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%乙酸水溶液、乙腈-0.1%乙酸水溶液作为流动相时的色谱分离效果, 实验发现, 当采用甲醇-0.1%乙酸水溶液为流动相时, 各被测成分均显示出较好的峰形及分离度。由于 YQT 中含有酸性成分, 色谱峰出现拖尾现象, 为解决此问题, 实验进一步考察了在流动相中添加不同比例的乙酸铵 (5、10、20 mmol/L) 时对各色谱峰的影响, 结果表明, 流动性中含 20 mmol/L 乙酸铵时各成分峰形尖锐, 分离度效果最优。因此, 最终确定甲醇-0.1%乙酸 (含 0.02 mol/L 乙酸铵) 水溶液为最佳流动相。此外, 采用梯度洗脱的方法可提高分离速度与效率, 在 7 min 内即可实现 10 种成分的有效分离。

3.2 样品提取方法的选择

查阅文献资料^[1-9]后发现, YQT 中 10 种成分的提取溶剂各不相同, 实验中考察了提取溶剂 (水、乙醇、乙腈和 10%、30%、50%、70%、90%、100% 甲醇) 对各被测成分响应值的影响。通过观察色谱图发现, 选择用 100% 甲醇对样品进行提取时, 各成分响应较高, 提取较为完全, 故确定纯甲醇作为提取溶剂。

3.3 检测模式的考察

根据 YQT 中 10 种指标成分的化学性质和色谱行为^[1-9], 本实验考察了正、负离子扫描方式对各被测成分响应值的影响, 实验结果发现, 正离子模式下蟛蜞菊内酯、穿心莲内酯、玉叶金花苷酸甲酯、 β -蜕皮甾酮产生的碎片离子响应值高且稳定, 而 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、脱水穿心莲内酯、山梔苷甲酯、绿原酸、京尼平苷酸、梔子苷在负离子模式下响应较好。因此, 本实验采用同一分析周期内正、负离子同时监测, 既兼顾了各被测成分质谱碎裂性质, 又极大地缩短了分析时间。

3.4 样品含量分析

从表 3 可以看出, 除京尼平苷酸、穿心莲内酯、蟛蜞菊内酯在个别批次样品中含量差异较大外, 其他 7 种成分的含量都较为接近, 这可能是由原料药材梔子、穿心莲及墨旱莲的来源、采收季节、加工炮制、贮藏方式差异所导致, 提示为了控制中药复方制剂质量的一致性, 除了在制剂生产过程中严格按工艺要求操作外, 更应该按标准严格控制原料药

材的质量, 唯有这样才能更好地保证药品质量的稳定性和有效性。

本实验采用 CA、PCA 及 OPLS-DA 共 3 种模式识别方法对定量测定结果进行分析, 筛选出 6 个引起质量差异的主要标志性成分, 分别为玉叶金花苷酸甲酯、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、山梔苷甲酯、穿心莲内酯、酯脱水穿心莲内酯、绿原酸, 而这些成分主要来源于玉叶金花、穿心莲和梔子。结合样品生产时间发现, 采购的时间间隔较久, 提示个别批次差异可能是不同时间段采购的穿心莲、玉叶金花和梔子投料存在质量差异所造成。生产企业采购饮片投料时, 应该严格按相关质量标准把控穿心莲、玉叶金花和梔子饮片的质量, 从源头进行药品质量控制; 同时在实际生产中, 对上述关键成分进行实施动态监测, 实时控制药品质量的稳定性, 实现高效、有针对性地对制剂进行质量一致性评价。

本研究首次采用 UPLC-MS/MS 多组分快速测定结合化学模式识别技术, 对不同批次 YQT 的质量进行了深入探索, 该分析思路及数据处理方法不仅能实现对中药制剂进行较为全面、系统和科学的分析与评价, 而且还可以快速筛选出引起药物批次间质量差异的标志性成分, 为药企投料提供合理建议。实验结果表明该方法简便、高效、科学, 可为 YQT 的质量控制研究提供新的科学依据和数据处理方法。

参考文献

- [1] 林雀跃, 罗永强, 张荣林, 等. HPLC 法同时测定壮药玉叶金花中 9 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(5): 765-770.
- [2] 张 晓, 唐力英, 吴宏伟, 等. 穿心莲现代研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 222-234.
- [3] 史永平, 孔浩天, 李昊楠, 等. 梔子的化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 281-288.
- [4] 马 利, 易 骏, 吴建国, 等. RP-HPLC 法同时测定不同产地墨旱莲中 6 个主要成分的含量 [J]. 福建中医药, 2017, 48(4): 60-62.
- [5] 夏爱军, 李 玲, 董 昕, 等. UHPLC-Q-TOF/MS 技术应用于中药旱莲草化学成分研究 [J]. 解放军药学学报, 2012, 28(5): 404-407.
- [6] 黄运喜, 易 骏, 吴建国, 等. 鳢肠不同部位抗骨质疏松活性及化学成分比较研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(8): 1229-1232.
- [7] 王雪梅, 张建胜, 戴 云, 等. 旱莲草总黄酮的提取及其体外抗氧化活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2009,

- 20(2): 356-358.
- [8] 肖培根. 新编中药志 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [9] 欧丽兰, 张 春, 朱 烨. HPLC 法测定倒扣草中蜕皮甾酮的含量 [J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32(4): 68-69.
- [10] 唐德智. HPLC 法测定玉叶清火片 3 种成分的含量 [J]. 海峡药学, 2016, 28(1): 50-53.
- [11] 唐德智. UPLC 波长切换法测定玉叶清火片中 3 种成分的含量 [J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(9): 26-27.
- [12] 初 芳, 刘 琳, 王 禹. 玉叶清火片中栀子苷的含量测定 [J]. 医学信息, 2013, 26(1): 103-104.
- [13] 郭玉岩, 马文保, 肖洪彬, 等. 基于 UPLC-MS 技术分析马钱子-甘草药对配伍汤液不同相态中毒效物质的变化规律 [J]. 中草药, 2017, 48(23): 4880-4884.
- [14] 李 静, 张 青, 肖春霞, 等. HPLC 波长切换法同时测定排毒养颜胶囊中 10 种成分 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4824-4830.
- [15] 林美好, 张楠淇, 王翠竹, 等. UPLC-MS/MS 测定大鼠尿样中 26-OH-PD 浓度的不确定度评定 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(4): 582-588.
- [16] 翟宇瑶, 段万里, 申国安, 等. QuEChERS-反相高效液相色谱-串联质谱法测定麦冬中多效唑、烯效唑 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(3): 591-595.
- [17] 熊 茜, 潘 媛, 张 婷, 等. 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 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2189-2196.
- [18] 周 霖, 姜晓芳, 左莉华, 等. 基于质谱-主成分分析法的冠心丹参胶囊中 10 个活性成分含量测定及质量评价研究 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(10): 1824-1831.
- [19] 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.
- [20] Han X, Zhang Y, Pi J X, *et al.* Pharmacokinetic study of ginsenoside Re after vaginal administration in rabbits by UPLC-MS/MS determination [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(3): 304-309.
- [21] Fan Q, Chen C, Huang Z, *et al.* Discrimination of *Rhizoma Gastrodiae* (Tianma) using 3D synchronous fluorescence spectroscopy coupled with principal component analysis [J]. *Spectrochim Acta A*, 2015, 136(2): 1621-1625.
- [22] Kong W J, Wang J B, Zang Q C, *et al.* Fingerprint-efficacy study of artificial *Calculus bovis* in quality control of Chinese materia medica [J]. *Food Chem*, 2011, 127(3): 1342-1347.