

· 中药工业 ·

UPLC-QTOF-MS 技术在摩罗丹浓缩丸 质量稳定性评价中的应用[△]

刘会云¹, 田颖瑞¹, 睢建亮¹, 王梦蕾¹, 殷苗苗¹, 王珍^{2,3,*}

1. 邯郸制药股份有限公司, 河北 邯郸 056000;

2. 复旦大学 生命科学学院, 上海 200030;

3. 河北工程大学 医学院附属医院, 河北 邯郸 056000

[摘要] **目的:** 利用液质联用技术对中药所含化学成分进行分析, 探究其在中药质量稳定性评价中的应用。**方法:** 采用超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱法(UPLC-QTOF-MS)对摩罗丹浓缩丸样品进行测定, 通过对比分析10个不同批次摩罗丹浓缩丸的检测结果, 并结合主成分分析(PCA), 对摩罗丹浓缩丸的质量稳定性进行评价。**结果:** 利用UPLC-QTOF-MS技术, 摩罗丹浓缩丸中共鉴定出367种化学成分。通过对比分析10个不同批次摩罗丹浓缩丸所含化学成分种类及数量, 得出不同批次样品所含化学成分的平均重复率达到92%, 并通过PCA证明其整体质量稳定性较好。**结论:** 利用液质联用技术结合PCA为摩罗丹浓缩丸的整体质量评价提供参考, 并为中药作用物质成分分析提供新的检测方法和思路。

[关键词] 摩罗丹浓缩丸; 超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱法; 质量稳定性; 主成分分析

[中图分类号] R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)09-1539-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190815004

Application of UPLC-QTOF-MS Technology in Quality Stability Evaluation of Moluodan Concentrated Pill

LIU Hui-yun¹, TIAN Ying-rui¹, SUI Jian-liang¹, WANG Meng-lei¹, YIN Miao-miao¹, WANG Zhen^{2,3,*}

1. Handan Pharmaceutical Co., Ltd., Handan 056000, China;

2. School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200030, China;

3. The Affiliated Hospital and Medical College, Hebei University of Engineering, Handan 056000, China

[Abstract] **Objective:** To analyze the chemical composition of traditional Chinese medicines by UPLC-QTOF-MS, and explore its application in the evaluation of quality stability of traditional Chinese medicines. **Methods:** Moluodan concentrated pill samples were determined by ultra-high-UPLC-QTOF-MS, combined with principal component analysis, the quality stability of Moluodan concentrated pill was evaluated by comparing and analyzing of the 10 different batches of Moluodan concentrated pill. **Results:** A total of 367 chemical constituents were identified in Moluodan concentrated pill by UPLC-QTOF-MS. By comparing and analyzing the chemical composition types and quantities of 10 different batches of Moluodan concentrated pill, it was concluded that the average repetition rate of chemical components in different batches of drugs reached 92%, and the overall quality was stable by principal component analysis. **Conclusion:** In this study, liquid chromatography-mass spectrometry combined with PCA analysis laid a foundation for the overall quality evaluation of Moluodan concentrated pill, and provided new detection methods and ideas for the analysis of the constituents of Chinese medicines.

[Keywords] Moluodan concentrated pill; UPLC-QTOF-MS; quality stability; PCA

中成药有效成分复杂, 药效物质基础不明确, 式, 以及成药的剂型和剂量、制剂加工工艺、制其质量稳定性与中药材的品种、产地、加工方 药设备、质量管理及控制方法、包装材料等因素

[△] **[基金项目]** 河北省自然科学基金青年项目(C2019402141); 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2019215); 邯郸市科学技术研究与发展计划项目(1727201061)

^{*} **[通信作者]** 王珍, 硕士生导师, 研究方向: 天然产物有效成分; Tel: (0310)8575123, E-mail: zhenwang12@fudan.edu.cn

有密切关系。窦志华^[1]提出中成药最突出的问题是产品质量不稳定,不同厂家生产的同一产品,甚至是同一厂家不同批次的产品质量参差不齐。刘静等^[2]基于国家样本抽验工作,提出影响中成药质量和安全的主要问题是原料质量和生产工艺。

摩罗丹浓缩丸作为由18味中药组成的大组方制剂,具有较好的临床效果^[3-5],其化学成分复杂,制剂工艺繁琐,并且产生药理活性的物质基础尚未明确;作为复方制剂,检测其中任何一种成分均不能体现其整体质量,中药中所含化学成分的种类和数量能比较全面地反映中药的内在质量^[6-7],所以通过对比不同批次间样本所含化学成分的种类和数量可以直接反映样本的质量稳定性。液质联用技术是指液相色谱串联质谱技术,适合复杂体系的成分分析,是目前复杂体系活性成分快速分离和鉴定的有力手段^[8-10]。另外,主成分分析(PCA)在中药材和中成药的鉴别与质量分析中应用也较为广泛^[11-13]。本研究利用超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱法(UPLC-QTOF-MS)技术对摩罗丹浓缩丸所含化学成分进行分析,并结合PCA,对样本的质量稳定性进行评价。

1 材料

1.1 仪器

Eksigent ekspert 型超高效液相仪(AB Sciex 公司); Triple TOF 5600 型高分辨质谱仪(AB Sciex 公司); Heraeus Fresco17 型离心机(Thermo Fisher Scientific 公司); BSA124S-CW 型天平(Sartorius 公司); JXFSTPRP-24 型研磨仪(上海净信科技有限公司); 明澈 D24 UV 型纯水仪(Merck Millipore 公司); PS-60AL 型超声仪(深圳市雷德邦电子有限公司)。

1.2 试药

甲醇、乙腈、甲酸(LC-MS 级, CNW Technologies 公司); *L*-2-氯苯丙氨酸(上海恒柏生物科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$)。

摩罗丹浓缩丸共10个批次,生产批号分别为:00518072、00518073、00518074、00518077、00518084、00518086、00518088、00518089、00518090、00518097,由邯郸制药股份有限公司生产。

2 方法

2.1 样品溶液制备

称取100 mg 摩罗丹浓缩丸粉末,加入500 μL 含有内标(*L*-2-氯苯丙氨酸)的提取液(80% 甲醇,内标质量浓度1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)涡旋混匀30 s;冰水浴中超声处理1 h;将提取液在4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径为859 mm)离心10 min;取出上清液,即得供试溶液。

2.2 分析方法

色谱条件:色谱柱为UPLC BEH C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm);流动相0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸-乙腈(B);梯度洗脱(0~6.5 min, 5%~30% B; 6.5~12.5 min, 30%~70% B; 12.5~22 min, 70%~100% B);柱温为40 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件:本实验采用电喷雾离子源,雾化气压:377.24 kPa,辅助气压:377.24 kPa,气帘气压:241.32 kPa,温度:550 $^{\circ}\text{C}$,喷雾电压:5500 V(正离子模式)或-4000 V(负离子模式)。质谱仪在控制软件控制下基于数据依赖型扫描(IDA)功能进行一级、二级质谱数据采集。在每个数据采集循环中,筛选出强度最强且 >100 的分子离子进行对应的二级质谱数据采集。轰击能量:40 eV,碰撞能差:20 V,15张二级谱图每50 ms。

2.3 数据处理

2.3.1 数据处理方法 将原始质谱数据导入Progenesis QI 软件,进行保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等工作,通过一级质谱精确质荷比和二级质谱碎片信息及相应裂解规律匹配法,结合中药数据库及相关文献对MS/MS数据峰进行物质鉴定。

2.3.2 PCA 本研究使用SIMCA V14.1 软件,对数据进行对数转换加中心化(CTR)格式化处理后,然后进行自动建模分析。

2.4 方法学验证

在确定了供试溶液的制备方法和色谱分离条件后,通过参照相关文献,本实验对摩罗丹浓缩丸UPLC-QTOF-MS分析进行了方法学验证,考察仪器稳定性、内标响应情况^[6-7]。

2.4.1 稳定性 取10个不同批次的摩罗丹浓缩丸,按照2.1项制备方法平行制备得10个供试溶液,从这10个供试溶液中分别取出20 μL 进行混合,得到

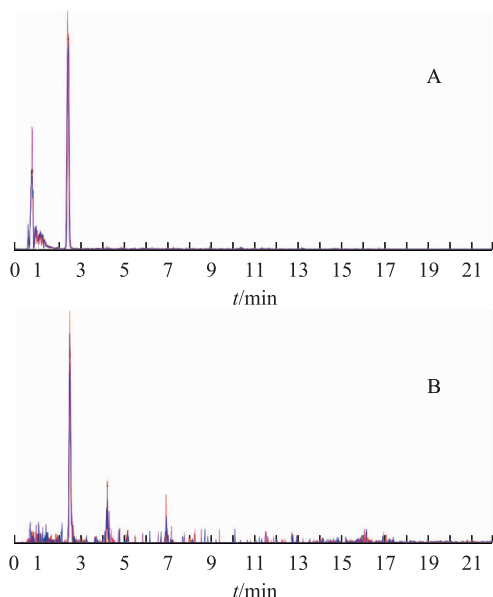
质控(QC)样品,平行进行3次,得到3个QC样品,分别为QC-001、QC-002、QC-003;按2.2项下分析方法分别进样进行检测,QC样品的检测是穿插在10个供试样品检测中间,并在检测结束后按2.3.2项下分析方法对QC样品进行PCA。

2.4.2 内标响应情况 对2.4.1项中所得3个QC样品中内标物L-2-氯苯丙氨酸按2.2项下分析方法进行检测。

3 结果与讨论

3.1 内标响应稳定性

通过对3个QC样品中内标物L-2-氯苯丙氨酸进行测定,得到3个总离子流图谱,对这3个谱图进行叠加处理,结果见图1。



注: A. 正离子模式; B. 负离子模式; 下同。

图1 QC样品中内标L-2-氯苯丙氨酸的总离子流图

由图1可以看到,正负离子模式下,QC样品中内标L-2-氯苯丙氨酸在总离子流分图中色谱峰的保留时间和响应强度重叠性较好,说明仪器在数据采集过程中的稳定性较好。

内标为外源引入的物质,QC样品中内标浓度相同,所以内标的响应差异越小($RSD \leq 20\%$),说明系统越稳定,数据质量越高。通过对QC样品中内标进行响应差异分析,得出内标L-2-氯苯丙氨酸在QC样品中正、负离子模式下响应差异RSD分别为14.3%和15.7%,均小于20%,说明本次实验数据质量较高,系统较稳定。

3.2 摩罗丹浓缩丸的UPLC-QTOF-MS检测结果及不同批次样品间质量评价

3.2.1 摩罗丹浓缩丸总离子流分图分析 因QC样品是由10个不同批次摩罗丹浓缩丸的供试品溶液混合得到的,为排除不同批次样本所含化学成分的差异,在对摩罗丹浓缩丸中所含化学成分进行定性分析的研究中,选择了QC样品作为研究对象。由于方法学验证结果良好,按2.2项下分析方法对QC-001样品进行测定,得到总离子流分图,结果见图2。

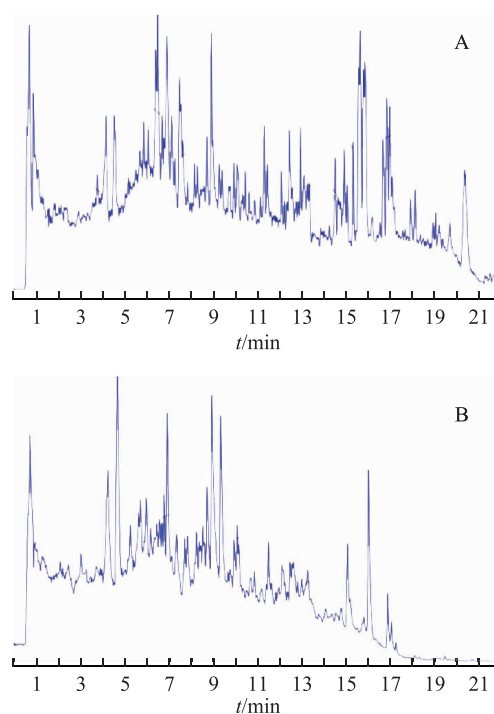


图2 摩罗丹浓缩丸QC样品总离子流分图

采用UPLC-QTOF-MS对摩罗丹浓缩丸样品进行测定,得到摩罗丹浓缩丸QC-001样品总离子流分图,根据该总离子流分图,按照2.3.1的数据处理方法,对总离子流分图中色谱峰进行物质鉴定。在正离子模式下,摩罗丹浓缩丸共鉴定出214种化学成分;负离子模式下,共鉴定出164种化学成分,正负离子模式下相同化学成分11种,所以摩罗丹浓缩丸中共鉴定出367种化学成分。

摩罗丹浓缩丸作为一个大处方制剂,所含化学成分较复杂,根据该药品的质量标准,仅有3项鉴别项和1项含量测定项,远远不足以反映药品的质量情况,这也是中药在质量控制方面的难点,利用UPLC-QTOF-MS技术快速一次性鉴定出该药品中所

含的 367 种化学成分，能够较为全面地反映药品的质量情况。

根据中药化学成分的结构类型，对鉴定出的化学成分进行进一步分类，摩罗丹浓缩丸中含有 64 种三萜类物质、38 种黄酮类物质、33 种生物碱类物质、33 种萜类物质、12 种糖和苷类物质、10 种有机酸及脂肪酸类物质、9 种苯丙素类物质、4 种氨基酸类及 3 种醌类物质等，其中三萜类、黄酮类、生物碱类及萜类数量较多，文献 [14-15] 表明，这几个种类中含有很多抗炎、抗菌、抗氧化药理作用的化学成分，通过对这些化学成分的进一步研究，能够进一步了解该药品的作用机理。

基于摩罗丹浓缩丸成分复杂多样，为了能够对其成分更加全面而系统的分析，笔者利用数据库，包括中科院上海有机所化学数据库(www.organchem.csd.cn)、台湾中医药资料库(http://tcm.cmu.edu.tw/)、Google scholar、Medline、CNKI、PubMed，根据摩罗丹浓缩丸组方中的药材，对这 367 种化学成分进行了药材一般来源归属，具体药材归属见表 1。从表 1 可以看出，18 味药材中鉴定出的化学成分数量不尽相同，其中来自茵陈、玄参、三七和延胡索中的化学成分较多，均超过 30 种。

表 1 摩罗丹浓缩丸中所含化合物药材归属统计			
药材	归属数量/种	药材	归属数量/种
茵陈	40	乌药	16
玄参	36	石斛	14
三七	36	泽泻	14
延胡索	35	茯苓	12
川芎	24	百合	11
当归	24	白术	8
麦冬	18	地榆	7
白芍	18	鸡内金	4
蒲黄	17	九节菖蒲	2

3.2.2 不同批次摩罗丹浓缩丸所含化学成分重复率分析 为了研究摩罗丹浓缩丸不同批次间的质量稳定性，本研究通过 UPLC-QTOF-MS 对 10 个不同批次的摩罗丹浓缩丸供试品溶液进行分析，得到各个批次样品的总离子流色谱图，对这 10 个图谱进行了叠加处理，结果见图 3。

从图 3 中可以看出，正负离子模式下 10 个不同批次摩罗丹浓缩丸总离子流分图能够较好地重叠，

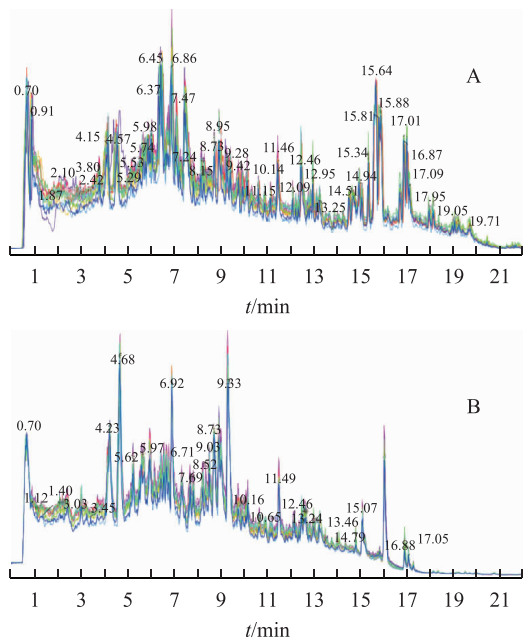


图 3 10 个不同批次摩罗丹浓缩丸总离子流分叠加图

从出峰时间和信号强度的重叠情况来看，样本各批次间所含化学成分种类及含量上均较相似，说明摩罗丹浓缩丸样本各批次质量差异性较小，总体质量稳定性较好。采用 UPLC-QTOF-MS 技术获得药品的总离子流分图，能够较全面地反映出药品的整体质量，该方法较稳定，且可重复性高。

为了更清晰地应用 UPLC-QTOF-MS 技术来表达各批次间样品所含化学成分种类的重复率，对各批样品鉴定出的化学成分种类及数量进行了进一步分析，结果见表 2~4。

表 2 正离子模式下不同批次样品所含化学成分重复率			
批号	鉴定出的化学成分数量/个	共有化学成分数量/个	重复率/%
00518072	205	185	90
00518073	193		96
00518074	207		89
00518077	203		91
00518084	205		90
00518086	207		89
00518088	202		92
00518089	209		89
00518090	209		89
00518097	207		89
平均值			90

表 3 负离子模式下不同批次样品所含化学成分重复率

批号	鉴定出的化学成分数量/个	共有化学成分数量/个	重复率/%
00518072	156	151	97
00518073	158		96
00518074	156		97
00518077	157		96
00518084	154		98
00518086	157		96
00518088	157		96
00518089	160		94
00518090	159		95
00518097	159		95
平均值			96

表 4 正负离子模式下不同批次样品所含化学成分重复率

批次	鉴定出的化学成分数量/个	共有化学成分数量/个	重复率/%
00518072	350	325	93
00518073	341		95
00518074	353		92
00518077	350		93
00518084	348		93
00518086	354		92
00518088	348		93
00518089	359		91
00518090	357		91
00518097	355		92
平均值			92

从表 2~3 可以看出, 10 个不同批次摩罗丹浓缩丸在正离子模式下鉴定出的化合物数量从 193~209 不等, 不同批次样品间共有化合物数量为 185 个, 所含化学成分的平均重复率为 90%; 负离子模式下鉴定出的化合物数量从 154~159 不等, 不同批次样本间共有化合物数量为 151 个, 所含化学成分的平均重复率达到 96%。

从表 4 中可以看出, 10 个不同批次摩罗丹浓缩丸样品鉴定出总化学成分数量差距较小, 最少 341 个, 最多 359 个, 共有化学成分为 325 个, 各批次间所含共有化学成分的平均重复率达到 92%。从不同批次样品所含化学成分种类的重复率角度来看, 说明摩罗丹浓缩丸样品各批次质量差异性较小, 质

量稳定性较好。

3.2.3 不同批次摩罗丹浓缩丸样品 PCA 为从整体上比较摩罗丹浓缩丸不同批次间的质量稳定性, 本研究按照 2.3.2 项下分析方法对 10 个批次的摩罗丹浓缩丸样品数据进行了 PCA, 得到 10 个批次样品 PCA 质量得分散点分布图和质量得分一维分布图, 结果见图 4~5。

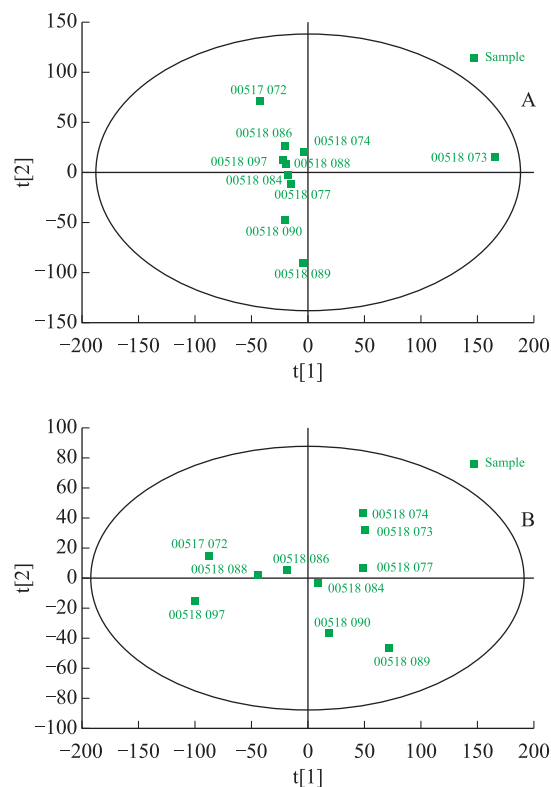


图 4 10 个不同批次摩罗丹浓缩丸样品 ($n=10$) PCA 质量得分散点分布图

图 4 中椭圆代表 95% 置信区间, 从图 4 可以看出, 在正离子模式下 00518073 批次样品在第一主成分上与其他批次之间有分离趋势, 而 00518072 和 00518089 批次样品在第二主成分上与其他批次之间有分离趋势, 其他批次均较集中。结合图 5 样品 PCA 质量得分一维分布图可以看出, 除 00518073 批外, 其他批次质量小于 2 个标准差; 在负离子模式下, 从图 4 中可以看出各批次之间分布较离散, 但结合图 5 发现, 负离子模式下所有批次质量小于 2 个标准差; 表明不同批次样品之间差异较小, 总体质量较为稳定。综上所述, 通过 10 个不同批次样品数据的 PCA 得出, 摩罗丹浓缩丸药品总体质量稳定性较好, 个别批次间略有差异。利用 UPLC-QTOF-MS 技术, 结合 PCA 方法, 能够从另一角度

反映出药品多批次间的质量稳定性。

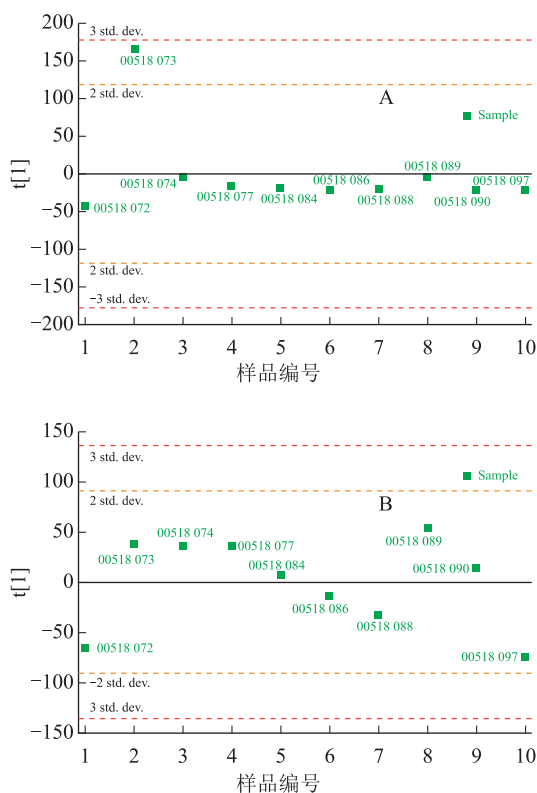


图5 10个不同批次摩罗丹浓缩丸样品
PCA质量得分一维分布图

4 结论

本研究利用 UPLC-QTOF-MS 技术对摩罗丹浓缩丸的化学成分进行测定, 鉴定出其含有 367 种化学成分, 其中三萜类、黄酮类、生物碱类及萜类数量较多, 比较全面地反映了摩罗丹浓缩丸的药效物质基础和质量情况, 同时也为下一步该药品的药理作用研究提供参考; 另外, 通过对比 10 个不同批次样品所含化学成分的种类和数量, 得出不同批次样品所含化学成分的平均重复率达到 92%, 进一步结合 PCA 结果, 利用 UPLC-QTOF-MS 技术对摩罗丹浓缩丸的整体质量稳定性进行了更加全面地评价, 10 个批次样品除 1 个批次外的其他批次间的质量偏差较小, 证明该药品的总体质量稳定性较好, 个别批次之间略有轻微差异。本研究将 UPLC-QTOF-MS 技术应用到中药制剂的质量评价中, 应用性强、稳定性

高, 为中药制剂的质量稳定性评价系统的建立提供了思路。

参考文献

- [1] 窦志华. 关于提高中成药质量的几点思考[J]. 基层中药杂志, 2001, 15(5): 43-44.
- [2] 刘静, 王翀, 冯磊, 等. 基于国家样本抽检工作的中成药质量和安全问题分析[J]. 中国现代中药, 2019, 21(3): 279-283.
- [3] 高树刚. 摩罗丹治疗慢性萎缩性胃炎 70 例疗效及病理分析[J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(8): 92-93.
- [4] 玉珍, 王刚, 陈光远, 等. 摩罗丹浓缩丸治疗慢性萎缩性胃炎(胃阴不足兼胃络瘀血证)的前瞻性随机对照临床试验[J]. 华西医学, 2007, 22(2): 287-290.
- [5] 解东媛, 刘正新, 李亚强, 等. 摩罗丹对萎缩性胃炎大鼠胃内分泌功能的影响[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(34): 2729-2733.
- [6] 沈国芳, 朱建, 裴一婧. UPLC-MS/MS 检测减肥类保健食品中的西布曲明及其去甲基衍生物[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(20): 1609-1611.
- [7] 李宁. 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[J]. 中草药, 2018, 49(19): 85-93.
- [8] 刘亚明, 李晓刚, 彭青. 中药质量控制与评价方法研究概况[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(4): 312-314.
- [9] 张立国, 胡甜甜, 张芳芳, 等. 丹参和紫丹参脂溶性成分的 UPLC 及 LC-MS/MS 分析[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(6): 1208-1215.
- [10] 张黎媛. 液质联用技术在中药质量控制中的应用[J]. 世界中医药, 2018, 13(2): 513-516.
- [11] 于鹤丹. 多元统计分析方法在中药质量评价中的应用[J]. 数理医药学杂志, 2006, 19(1): 85-87.
- [12] 周霖, 孙志, 薛文华, 等. 基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的丹灯通脑软胶囊质量控制研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3279-3284.
- [13] 张茹萍, 何昱, 石森林, 等. HPLC 指纹图谱结合主成分分析评价不同产地雷公藤药材质量[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(11): 1338-1344.
- [14] 罗艳, 王寒, 原忠. 地榆中三萜皂苷类成分及其抗炎活性研究[J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(2): 138-141.
- [15] 曹伟国, 刘志勤, 邵云, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, 23(12): 2241-2247.

(收稿日期: 2019-08-15 编辑: 王笑辉)