

至宝三鞭丸的定量“制剂质量标志物”研究

李涛^{1,2#}, 赵小亮^{2#}, 高文雅¹, 焦玥², 刘洋², 王志国², 王官连^{3*}, 杜茂波^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室, 北京 100700; 3. 烟台中亚至宝药业有限公司, 山东 烟台 264000)

摘要: 在至宝三鞭丸的定性“制剂质量标志物”的基础上, 筛选出其定量“制剂质量标志物”, 并评价至宝三鞭丸多个批次制剂间的含量一致性。建立同时测定至宝三鞭丸中 34 种化学成分的 HPLC-MS/MS 方法, 分析 16 批次制剂中各成分含量的一致性, 并采用一法通用策略分析各成分在中药制剂-血浆-脑组织-脑脊液的移行情况。方法经线性范围、加样回收率、精密度、稳定性和重复性等考察确证适合至宝三鞭丸中以上成分的测定。加样回收率为 85.10%~105.07%, 精密度 RSD 为 1.37%~4.58%, 重复性 RSD 为 3.00%~12.45%。至宝三鞭丸中各成分含量均低于 1 mg·g⁻¹, 含量和日用剂量耐斯糖最高, 其次为松果菊苷、芍药苷、蛇床子素和丹皮酚; 系统聚类分析结果显示至宝三鞭丸普通制剂之间的含量一致性较好; 松果菊苷、毛蕊花糖苷、远志山酮 III、 β -蜕皮甾酮、蛇床子素、23-乙酰泽泻醇 B、甘草苷和甘草酸等的含量在批次间的差异较小。主成分分析结果显示, 小檗碱、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1、松脂醇二葡萄糖苷、细叶远志皂苷等的含量是影响批次间分组的主要因素。动物实验结果显示, 蛇床子素、丹皮酚、甘草苷可被吸收入血, 并通过血脑屏障进入脑组织。本研究的动物实验得到中国中医科学院中药研究所伦理委员会的批准(编号: 2020B071)。研究确定以上 31 种成分是至宝三鞭丸中定量“制剂质量标志物”的基本组成。本研究建立的 HPLC-MS/MS 分析方法灵敏、准确和快速, 可用于至宝三鞭丸的 34 种化学成分同时定量和多批次制剂的含量一致性评价, 为至宝三鞭丸定量“制剂质量标志物”的筛选及质量控制研究提供了方法基础。

关键词: 至宝三鞭丸; 制剂质量标志物; 含量测定; 质量一致性; HPLC-MS/MS

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)07-1770-10

Screening of quantitative preparation quality markers of Zhibao Sanbian Wan

LI Tao^{1,2#}, ZHAO Xiao-liang^{2#}, GAO Wen-ya¹, JIAO Yue², LIU Yang², WANG Zhi-guo²,
WANG Guan-lian^{3*}, DU Mao-bo^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Basic Research on Prevention and Treatment of Major Diseases, Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Yantai Zhongya Zhibao Pharmaceutical Co., Ltd., Yantai, 264000, China)

Abstract: On the basis of the qualitative preparation quality markers of Zhibao Sanbian Wan (ZBSBW), we screened out the quantitative markers and evaluated the content consistency of ZBSBW. A method capable of simultaneously determining 34 compounds in ZBSBW was established based on HPLC-MS/MS, and 16 batches of

收稿日期: 2022-09-19; 修回日期: 2022-12-19.

基金项目: 中国中医科学院创新工程项目 (CI2021A04313, CI2021B015); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (ZZ2019004, JJPY2022003, ZZ14-YQ-041); 中国中医科学院中药研究所横向课题 (H2021042).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-535-6693153, E-mail: 1143246299@qq.com;

Tel: 86-10-64032658, E-mail: mbdu@icmm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1062

ZBSBW were simultaneously analyzed by this method. Furthermore, we explored a general strategy for analyzing the component migration in preparation, plasma, brain tissue and cerebrospinal fluid. The methodological investigation was confirmed by linear range, recovery (85.10%–105.07%), precision (RSD: 1.37%–4.58%), stability, and repeatability (3.00%–12.45%), the established method was suitable for the detection and quantification of the compounds in ZBSBW. The contents of compounds in ZBSBW were all lower than $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, and the contents and daily dose of nystose were the highest, followed by echinacoside, paeoniflorin, osthole and paeonol. The results of systematic clustering showed that the contents were consistent for ordinary preparations of ZBSBW. The principal component analysis showed that the components of berberine, ginsenoside Re, ginsenoside Rg1, pinoselin diglucoside and tenuifolin had large variation, which contributed significantly to the grouping. The contents of echinacoside, verbascoside, polygalaxanthone III, β -ecdysterone, osthole, alisol B 23-acetate, liquiritin and glycyrrhizic acid were stable from batch to batch. The animal experiment results showed that osthole, paeonol and liquiritin in ZBSBW could be absorbed into the blood and enter the brain tissue by passing through the blood-brain barrier. All animal studies were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences (No. 2020B071). The above compounds contributed the quantitative preparation quality markers of ZBSBW. In conclusion, the HPLC-MS/MS method established in this study was sensitive, accurate and rapid, and could be used for simultaneous quantification of 34 compounds and content consistency evaluation of multiple batches of preparations in ZBSBW. The result provided a methodological basis for the screening of quantitative preparation quality markers and material basis research of ZBSBW.

Key words: Zhibao Sanbian Wan; quantitative preparation quality marker; content determination; quality consistency; HPLC-MS/MS

中药丸剂的使用历史悠久,为“丸散膏丹”成方制剂之首,众多使用至今的中医名方如六味地黄丸、逍遥丸等均为中药丸剂。据统计,《中华人民共和国药典(一部)》(2020版)收录了1 607种成方或单味药制剂,中药丸剂有412种,在各剂型中占比最多^[1,2]。中药丸剂多以饮片细粉形式直接入药,并且一般配伍药味多、辅料用量大,所以中药丸剂的物质基础研究相对复杂,如化学成分具有结构类型多、含量差异大、成分含量低等特点,因此需要建立中药丸剂多组分覆盖、高灵敏定量的研究方法和策略。由于受各药材生长环境、采收时节、加工方式等因素的影响,中药制剂不同批次间的化学成分可能存在差异,这种差异可能会导致药效的不一致,进而对临床疗效有一定影响,因此对制剂不同批次间的含量进行一致性分析,是保证中药制剂安全有效、质量可控的必然要求。高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS/MS)分析技术具有覆盖度强、准确、快速的特点,质谱的多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式可依据化合物母离子和子离子的质荷比信息进行定量,能够提高检测的灵敏度和定量的准确性,在中药多组分定量方面应用广泛^[3];化学模式识别,如聚类分析和主成分分析技术可以对批次间的数据进行降维和分类,可用于中药制剂的一致性评价^[4]。基于HPLC-MS/MS和相关化学模式识别技术开展中药丸剂批次间的含量一致性分析是中药制剂质量评价和控

制的有效途径。并且,针对经典的名优中药丸剂建立相关分析方法和一致性评价策略,对中药成方制剂的质量评价和控制具有一定的示范意义。

至宝三鞭丸,收录于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂》(第十六册),由海狗鞭、狗鞭、鹿鞭、人参、淫羊藿、肉苁蓉等四十多味中药材组成,具有补血生精、健脑补肾的功效^[5]。至宝三鞭丸的临床使用相当广泛,在中国、日本、东南亚、欧美等30多个国家和地区均有销售。前期,作者^[6-8]提出用“制剂质量标志物”进行中药制剂质量评价和控制的研究思路,已综合利用HPLC指纹图谱、高分辨MS技术等对至宝三鞭丸主要的化学组成进行了分析,结果从至宝三鞭丸中鉴定出黄酮类、萜类及皂苷类、有机酸类、色酮类、苯乙醇苷类、酚类、香豆素类、生物碱类、蒽醌类、木脂素类、内酯类等10余种结构类型共80多个化学成分,继而通过关联化学成分的活性与其药理作用,初步确定了至宝三鞭丸60多个定性“制剂质量标志物”^[9]。本研究根据至宝三鞭丸化学成分鉴定结果、药典中对各单味饮片含量控制的指标性成分,以及各化学成分的可检测性,基于HPLC-MS/MS技术建立了同时测定至宝三鞭丸中34种化学成分的分析方法,并将这一方法应用于16批次至宝三鞭丸制剂各化学成分的含量测定、一致性评价和中药制剂-血浆-脑组织-脑脊液的转移分析,筛选其定量“制剂质量标志物”,这将为至宝三鞭

丸制剂的进一步质量评价和控制提供数据和技术支撑,相关研究策略也将为其他中药丸剂的研究提供思路参考。

材料与方法

仪器设备 HPLC-MS/MS系统(美国AB Sciex公司),包括ExionLC-20AC高效液相色谱仪、IonDrive™ Turbo V离子源、Sciex 6500+三重四极杆检测器、Analyst 1.7数据采集系统和Mutiquant 3.0.3数据处理系统等;KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q Integral 5超纯水制备仪(美国Millipore公司);Precellys Evolution生物样品均质器和Precellys氧化锆磁珠试剂盒(法国Bertin公司);Targin VX-III多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司);Rotanta 460R高速冷冻离心机(德国Hettich公司);Easyflow独立通气笼具(意大利Tecniplast公司);甲醇和甲酸(北京Dikma公司),其他试剂均为色谱级。

药品与试剂 至宝三鞭丸制剂样品由烟台中亚医药保健酒有限公司生产,样品编号(批号)普通制剂为S1(200710)、S2(200811)、S3(200814)、S4(200815)、S5(201018)、S6(201019)、S7(201123)、S8(201124)、S9(201125)、S10(201126)、S11(201128)、S12(201129)、S13(201130)、S14(210301)、S15(210403),精品制剂为S16(精品2021);耐斯糖(批号:PRF20040322)、莫诺昔(批号:PRF21053101)、马钱苷(批号:PRF20051842)和23-乙酰泽泻醇B(批号:PRF21040201)购自成都普瑞法科技开发有限公司,梓醇(批号:L04J12Y136474)、地黄苷D(批号:L04J12Y136475)、吡啶美辛(批号:Y01S8C42808)和双氯芬酸(批号:H15O9Z72393)购自上海源叶生物科技有限公司,原儿茶酸(批号:PS012560)、阿魏酸(批号:PS012244)、远志山酮III(批号:PS010505)、鞣花酸(批号:PS020571)、 β -蜕皮甾酮(批号:PS000094)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(批号:PS011341)、人参皂苷Re(批号:PS011717)、人参皂苷Rg1(批号:PS010153)、丹皮酚(批号:PS000281)、淫羊藿苷(批号:PS011515)、甘松新酮(批号:PS010660)、细叶远志皂苷(批号:PS000954)、人参皂苷Rb1(批号:PS011946)和23-乙酰泽泻醇C(批号:PS012675)购自成都普思生物科技股份有限公

司,松脂醇二葡萄糖苷(批号:MUST-21032510)、松果菊苷(批号:MUST-21042513)、芍药苷(批号:MUST-21051210)、甘草苷(批号:MUST-21052114)、毛蕊花糖苷(批号:MUST-20092315)、3,6'-二芥子酰基蔗糖(批号:MUST-20062304)、甘草酸(批号:MUST-20122305)、大黄素(批号:MUST-

20092210)、大黄素甲醚(批号:MUST-20072304)、黄柏碱(批号:MUST-20072610)、毛蕊异黄酮苷(批号:MUST-21030920)、小檗碱(批号:MUST-20073011)、蛇床子素(批号:MUST-21041602)和黄芪甲苷(批号:MUST-21031508)购自成都曼思特生物科技有限公司。上述对照品的纯度均在98%以上。

实验动物 雄性Wistar大鼠,SPF级,6~7周龄,实验动物质量合格证号110011220108553267,购自北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号:SCXK(京)2021-0006)。所有动物饲养于独立通气笼具(长×宽×高:461 mm×274 mm×229 mm),保持实验室环境温度为22℃,湿度为50%左右,并提前喂养1~2周适应饲养环境,自由饮水和食用商业饲料。给药前,动物禁食12 h,自由饮水。本研究的动物实验得到中国中医科学院中药研究所伦理委员会的批准(编号:2020B071)。

至宝三鞭丸供试品溶液的制备 取至宝三鞭丸小蜜丸(6.25 g/盒),剪碎,然后取剪碎后的至宝三鞭丸样品约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入75%甲醇溶液10 mL,称定重量,振摇至全部溶散,室温超声30 min后,取出,放冷,再次称定重量,并用75%甲醇补足失重,摇匀,滤过,再取续滤液2 mL,用纯水定容至10 mL,摇匀,于20 000×g离心15 min,上清即为至宝三鞭丸供试品溶液。

对照品及内标溶液的配制 精密称取各对照品约20 mg,分别置于5或10 mL量瓶中,加入适量溶剂,超声配制成单个对照品储备液。其中,鞣花酸用少量二甲亚砜溶解,耐斯糖、淫羊藿苷、毛蕊异黄酮苷和3,6'-二芥子酰基蔗糖用50%甲醇溶解,之后再用50%甲醇配制至10 mL;其余对照品用甲醇溶解和配制至5 mL。吡啶美辛、双氯芬酸分别作为正离子和负离子模式下的内标,用50%甲醇溶解配置成内标储备液,临用前配制成含吡啶美辛和双氯芬酸均为20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。上述对照品溶液均低温密封保存。

HPLC-MS/MS检测条件 色谱条件:色谱柱为BEH HSS T3色谱柱(1.8 μm , 2.1 mm×100 mm,美国Waters公司);流动相为A(水,含0.1%甲酸)-B(甲醇),梯度洗脱程序:0~9.0 min, 20%~95% B; 9.0~12.0 min, 95% B; 12.0~12.01 min, 95% B~20% B; 12.01~15.0 min, 20% B。流速为0.2 mL·min⁻¹;柱温为35℃;样品室温度为4℃;进样量为2 μL 。质谱条件:电喷雾离子源(ESI),采用MRM模式,正离子和负离子同时扫描,正离子模式下内标为吡啶美辛,负离子模式下内标为双氯芬酸;气帘气(N₂)为40 psi,碰撞气(N₂)为9 psi,喷雾电压为5 500 V或-4 000 V,雾化温度

为 550 °C, 雾化气 (ion source gas 1, N₂) 和辅助气 (ion source gas 2, N₂) 均为 55 psi。各离子对的去簇电压、碰撞能量、驻留时间等质谱参数结果见表 1。

方法学考察

线性关系及定量限考察 精密吸取 34 种对照品储备液适量于同一量瓶, 75% 甲醇溶液稀释并定容至刻度, 混合对照品溶液母液浓度为耐斯糖 599.84 μg·mL⁻¹、梓醇 9.58 μg·mL⁻¹、地黄苷 D 6.05 μg·mL⁻¹、原儿茶酸 14.82 μg·mL⁻¹、莫诺苷 80.07 μg·mL⁻¹、松脂醇二葡萄糖苷 10.07 μg·mL⁻¹、松果菊苷 621.60 μg·mL⁻¹、马钱苷 80.00 μg·mL⁻¹、芍药苷 200.16 μg·mL⁻¹、甘草苷 40.28 μg·mL⁻¹、毛蕊花糖苷 99.40 μg·mL⁻¹、阿魏酸 5.19 μg·mL⁻¹、远志山酮 III 11.12 μg·mL⁻¹、3,6'-二芥子酰基蔗糖 49.78 μg·mL⁻¹、鞣花酸 19.81 μg·mL⁻¹、甘草酸 129.69 μg·mL⁻¹、大黄素 59.49 μg·mL⁻¹、大黄素甲醚 30.28 μg·mL⁻¹、毛蕊异黄酮苷 10.82 μg·mL⁻¹、β-蜕皮甾酮 39.92 μg·mL⁻¹、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 10.31 μg·mL⁻¹、人参皂苷 Re 9.87 μg·mL⁻¹、人参皂苷 Rg1 19.86 μg·mL⁻¹、丹皮酚 151.53 μg·mL⁻¹、淫羊藿苷 150.74 μg·mL⁻¹、细叶远志皂苷 10.37 μg·mL⁻¹、人参皂苷 Rb1 30.18 μg·mL⁻¹、23-乙酰泽泻醇 C 3.22 μg·mL⁻¹、蛇床子素 119.81 μg·mL⁻¹、黄芪甲苷 5.54 μg·mL⁻¹ 和 23-乙酰泽泻醇 B 41.48 μg·mL⁻¹, 其中黄柏碱 474.80 ng·mL⁻¹、小檗碱 664.00 ng·mL⁻¹ 和甘松新酮 521.60 ng·mL⁻¹, 先稀释 4 倍后再按倍数等级稀释, 制备成混合对照品系列溶液。分别取上清液 900 μL, 加入内标溶液 100 μL, 按“HPLC-MS/MS 检测条件”项下方法检测, 重复 3 次, 以峰面积 *Y* (对照品峰面积与内标峰面积之比) 对质量浓度 *X* (对照品质量浓度与内标质量浓度之比) 绘制标准曲线并进行计算, 得到回归方程、相关系数和线性范围。检测低浓度及以下浓度混合对照品, 以信噪比 ≥ 10 考察定量限。

精密度 将“线性关系及定量限考察”项下配制的混合对照品溶液母液稀释 20 和 100 倍, 制成高浓度和低浓度混标溶液。分别取高浓度和低浓度混标溶液 900 μL, 加入内标溶液 100 μL, 按“HPLC-MS/MS 检测条件”项下方法检测, 连续进样 6 次, 测定 34 种化学成分及内标的峰面积, 计算 RSD。

重复性 取同一批次至宝三鞭丸样品, 按“至宝三鞭丸供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份样品。分别取上清液 900 μL, 加入内标溶液 100 μL, 按“HPLC-MS/MS 检测条件”项下方法检测, 进行含量测定, 计算 RSD。

加样回收率 取同一批次已知各成分含量的至宝三鞭丸, 平行称取 6 份样品, 分别加入质量浓度相近的混合对照品溶液, 按“至宝三鞭丸供试品溶液的制备”

制备, 取上清液 900 μL, 加入内标溶液 100 μL, 按“HPLC-MS/MS 检测条件”项下方法检测, 进行含量测定, 计算回收率。

稳定性 取同一批次至宝三鞭丸样品, 按“至宝三鞭丸供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液, 取上清液 900 μL, 加入内标溶液 100 μL, 分别在制备后 0、4、8、12 和 24 h 按“HPLC-MS/MS 检测条件”项下方法检测, 进行含量测定, 计算 RSD。

至宝三鞭丸样品含量测定 取至宝三鞭丸样品, 按“至宝三鞭丸供试品溶液的制备”项下方法制备, 取上清液 900 μL, 加入内标溶液 100 μL, 按“HPLC-MS/MS 检测条件”项下方法检测, 进行含量测定, 每批次至宝三鞭丸样品平行 3 份。计算各化学成分在至宝三鞭丸中的质量分数, 计算 16 批次各成分的含量均值和 RSD。根据至宝三鞭丸的成人日用量 (6.25 g/天) 计算各化学成分的日用剂量。

含量一致性分析 将各化学成分的含量进行均一化处理 (即用每批次各成分的含量值除以 16 批次制剂成分均值), 将均一化处理后的 16 批至宝三鞭丸数据结果导入 Origin 软件进行系统聚类分析和主成分分析, 得到各批次样品聚类结果与各成分得分图、载荷图等, 分析样品的分类结果及对分类有重要贡献的成分。

血浆、脑脊液和脑组织中移行成分测定 大鼠 6 只, 3 只按临床等效剂量的 5 倍, 即 4 g·kg⁻¹ 大鼠体重灌胃至宝三鞭丸 (药物制备方法: 取剪碎后的至宝三鞭丸样品约 20 g, 用 50 mL 热水振摇至全部溶解, 然后超声溶解, 剂量合 10 mL·kg⁻¹ 大鼠体重); 3 只作为空白对照, 按 10 mL·kg⁻¹ 灌胃纯水。每日给药一次, 连续 3 天。最后一次给药后, 分别在 0.25、0.5、1 和 2 h 后微麻, 从眼眶采集全血约 0.5 mL, 制备血浆 (EDTA·K₂ 抗凝, 4 °C、2 000 ×g 下离心 15 min, 取上清即为血浆)。最后一个时间点处死大鼠, 从枕骨大孔取脑脊液, 4 °C、2 000 ×g 下离心 15 min, 上清为脑脊液; 取全脑, 用 4 °C 生理盐水快速清洗, 吸干水分后称重, 置氧化锆磁珠试剂盒中, 然后加入 4 倍质量体积生理盐水混匀, 放入生物样品均质器中, 按以下程序匀浆: 4 °C、8 000 r·min⁻¹ 振荡 30 s, 停 30 s, 再次 8 000 r·min⁻¹ 振荡 30 s, 制备成脑组织匀浆液。样品分装, -80 °C 冻存。测定前, 取大鼠空白及给药后的 0.25、0.5、1 和 2 h 时间点的混合样品各 100 μL (脑脊液和脑组织匀浆液为 2 h 的样品), 加入 300 μL 甲醇, 8 000 r·min⁻¹ 涡旋振荡 5 min, 然后 4 °C、20 000 ×g 下离心 15 min, 上清即为制备后的大鼠血浆、脑组织和脑脊液样品。以上样品按“HPLC-MS/MS 检测条件”项下方法检测, 对比分析至宝三鞭丸转移到大鼠血浆、脑组织和脑脊液中的成分情况。

结果

1 HPLC-MS/MS分析

在仪器低质量模式下进行各化学成分的质谱分析, 根据对照品确定合适的加合母离子, 确定正负电离模式; 根据生成的二级质谱图谱和可能的裂解规律, 找出每个化学成分稳定出现且丰度高的子离子; 进一步对离子对的碰撞能量、去簇电压等质谱参数进行优化; 并优化样品的HPLC分离条件。结果确定了34种化学成分的定量离子对和相应的碰撞能量、去簇电压、保留时间等HPLC-MS参数, 见表1。

由于样品中黄芪甲苷含量较低(供试品溶液浓度为 $0.032\sim 0.068\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 选取的785.5/143.1离子对的定量限($0.69\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)不能满足定量的要求, 而其加钠母离子对807.3/807.3的定量限($0.011\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)更为合适, 因此黄芪甲苷采用807.3/807.3加钠母离子对进行

定量, 785.5/143.1作为定性离子对。另外, 检测灵敏度母离子对更高的化学成分还有23-乙酰泽泻醇B、3,6'-二芥子酰基蔗糖等, 但由于他们在样品中含量相对较高, 所以对这些化合物仍采用母离子/子离子的离子对定量。各化学成分的MRM色谱图见图1。

2 方法学考察

至宝三鞭丸中各化学成分在相应浓度范围内相关系数均在0.997以上, 线性关系良好, 各成分的标准曲线及定量限结果见表2。连续进样6次, 各成分及内标峰面积的RSD为1.37%~4.58%, 表明仪器的精密度良好。样品中加入一定量的对照品, 含量在 $0.1\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 以上的成分的回收率为85.77%~107.37%; 含量在 $0.1\ \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 以下的成分的回收率为85.10%~115.10%, 表明提取方法良好。样品平行制备6份样品, 各成分含量及内标峰面积RSD为3.00%~5.45%, 表明制备方

Table 1 Ions and fragmentations information used in multiple reaction monitoring mode for each compound in Zhibao Sanbian Wan

Compound ID	Compound name	Formula	Ionization mode	Transition	Dwell time/ms	Declustering potential/V	Collision energy/eV	Retention time/min
1	Nystose	$\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_{21}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	665.1/179.1	20	-180	-40	1.31
2	Catalpol	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	361.0/199.0	20	-65	-12	1.41
3	Rehmannioside D	$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_{20}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	685.6/263.1	20	-180	-27	1.65
4	Protocatechuate	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	153.1/109.1	20	-100	-20	3.24
5	Morrioniside	$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	405.3/243.3	20	-38	-16	4.39
6	Pinoselin diglucoside	$\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	681.5/519.4	20	-135	-20	5.37
7	Echinacoside	$\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{O}_{20}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	785.2/161.2	20	-220	-50	5.45
8	Loganin	$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	389.3/227.3	20	-30	-15	5.66
9	Paeoniflorin	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	479.2/327.2	20	-20	-20	5.76
10	Liquiritin	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	417.3/255.1	20	-110	-28	6.33
11	Verbascoside	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	623.2/161.2	20	-160	-43	6.35
12	Ferulic acid	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	193.1/133.9	20	-30	-23	6.37
13	Polygalanone III	$\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	567.2/345.1	20	-38	-45	6.40
14	3,6'-Disinapoylsucrose	$\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{O}_{19}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	753.3/205.0	20	-180	-48	6.68
15	Ellagic acid	$\text{C}_{14}\text{H}_6\text{O}_8$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	301.2/283.9	20	-80	-40	6.93
16	Glycyrrhizic acid	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	821.9/351.1	20	-210	-60	10.42
17	Emodin	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	269.2/225.2	20	-80	-36	11.80
18	Physcion	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	283.1/240.1	20	-80	-34	12.81
IS1	Diclofenac	$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	294.1/250.1	20	-78	-18	10.76
19	Phellodendrine	$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	342.1/192.2	20	64	33	4.09
20	Calycosin-7-glucoside	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	447.1/285.1	20	100	26	6.13
21	Berberine	$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	336.3/320.3	20	56	42	6.87
22	β -Ecdysterone	$\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	481.3/371.3	20	130	20	7.24
23	Kaempferol-3-O-rutinoside	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	595.2/287.2	20	180	30	7.32
24	Ginsenoside Re	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	969.7/789.7	20	270	61	8.53
25	Ginsenoside Rg1	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	823.2/643.2	20	129	56	8.61
26	Paeonol	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	167.1/121.1	20	60	29	8.64
27	Icariin	$\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	677.5/369.2	20	240	44	8.94
28	Nardosinone	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	251.1/135.1	20	120	15	9.69
29	Tenuifolin	$\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_{12}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	703.4/673.4	20	290	56	9.96
30	Ginsenoside Rb1	$\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{23}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1131.7/789.3	20	260	75	10.45
31	Alisol C 23-acetate	$\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_6$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	529.4/451.4	20	160	32	10.60
32	Osthole	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	245.2/189.2	20	115	20	10.66
33	Astragaloside IV	$\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{14}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	807.3/807.3	20	160	31	11.18
			$[\text{M}+\text{H}]^+$	785.5/143.1	20	180	22	11.18
34	Alisol B 23-acetate	$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	515.7/437.3	20	152	22	12.36
IS2	Indomethacin	$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{ClNO}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	358.1/139.1	20	120	26	10.72

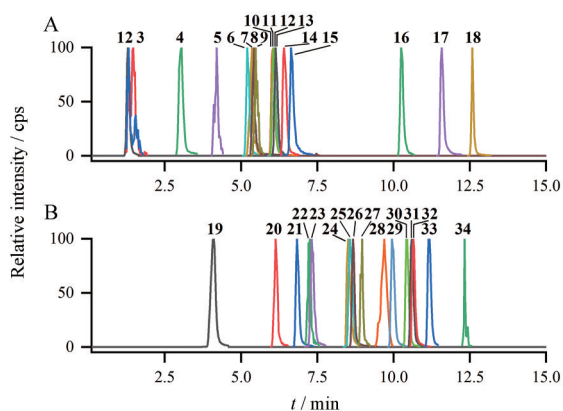


Figure 1 Multiple reaction monitoring chromatograms of 34 compounds of Zhibao Sanbian Wan in negative (A) and positive (B) ion mode. See Table 1 for the name of each compound

法重复性良好。样品制备后 0、4、8、12 和 24 h 测定, 结果各成分及内标的峰面积 RSD 为 5.51%~14.32%, 表明各成分稳定性良好。以上方法学考察结果均符合中国药典《分析方法验证指导原则》的规定^[1]。

3 含量测定

在至宝三鞭丸中共有 31 种化学成分可以定量, 黄柏碱、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和甘松新酮在供试品溶液中低于定量限, 各成分含量结果见图 2。31 种指标成分的含量均低于 $1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 耐斯糖的含量最高 ($0.37\sim 0.84 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 18.71%), 其次为松果菊苷 ($0.07\sim 0.45 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 26.34%)、芍药苷 ($0.11\sim 0.37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 30.86%)、蛇床子素 ($0.10\sim 0.22 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 17.00%) 和丹皮酚 ($0.07\sim 0.14 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 19.85%), 以上 31 种化学成分含量的总和约 $1.58\sim 2.44 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

4 制剂含量一致性评价

至宝三鞭丸中 31 种化学成分含量相差较大 ($0.000\ 027\sim 0.84 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), 因此将各成分的含量进行均一化处理, 16 批次至宝三鞭丸样品系统聚类分析与主成分分析结果见图 3。从聚类结果图 3A 可知, 至宝三鞭丸制剂分为 2 类, 普通制剂 S1~S13 及 S15 分为一类, 精品制剂 S16 及普通制剂 S14 分为 1 类, 这种自然

Table 2 Calibration curve parameters of 34 compounds in Zhibao Sanbian Wan. $^* \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; LOQ: Limit of quantitation; LOD: Limit of determination

Compound	Regression equation	Linearity range/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Correlation coefficient	LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Nystose	$Y = 1.71 \times 10^6 X - 4.01 \times 10^6$	1.17–18.75	0.999 8	0.029	0.010
Catalpol	$Y = 8.59 \times 10^5 X - 0.96 \times 10^4$	0.019–0.60	0.999 0	0.019	0.006
Rehmannioside D	$Y = 5.09 \times 10^5 X + 1.28 \times 10^3$	0.024–0.76	0.999 3	0.024	0.008
Protocatechuate	$Y = 2.82 \times 10^7 X - 8.71 \times 10^4$	0.058–0.93	1.000 0	0.019	0.006
Morroniside	$Y = 6.14 \times 10^5 X - 2.97 \times 10^4$	0.16–5.00	0.999 4	0.078	0.026
Pinoresinol diglucoside	$Y = 8.48 \times 10^5 X - 5.76 \times 10^3$	0.013–0.63	0.999 8	0.013	0.004
Echinacoside	$Y = 6.37 \times 10^6 X - 3.20 \times 10^6$	0.61–9.71	0.999 3	0.090	0.030
Loganin	$Y = 8.37 \times 10^4 X + 0.34 \times 10^3$	0.31–5.00	0.999 1	0.078	0.026
Paeoniflorin	$Y = 2.91 \times 10^5 X + 1.01 \times 10^5$	0.78–12.51	0.999 2	0.087	0.029
Liquiritin	$Y = 6.89 \times 10^7 X - 2.38 \times 10^6$	0.079–2.52	0.999 9	0.002	0.001
Verbascoside	$Y = 2.11 \times 10^6 X - 1.59 \times 10^6$	0.39–3.11	0.999 9	0.014	0.005
Ferulic acid	$Y = 2.13 \times 10^7 X + 1.34 \times 10^5$	0.020–0.32	0.998 8	0.002	0.001
Polygalanone III	$Y = 1.18 \times 10^7 X - 8.26 \times 10^4$	0.022–0.70	0.999 7	0.005	0.002
3,6'-Disinapoylsucrose	$Y = 9.43 \times 10^6 X - 3.18 \times 10^5$	0.20–3.11	0.999 6	0.065	0.022
Ellagic acid	$Y = 5.11 \times 10^6 X - 2.70 \times 10^4$	0.077–1.24	0.999 6	0.077	0.026
Glycyrrhizic acid	$Y = 2.10 \times 10^6 X - 1.28 \times 10^5$	0.26–4.05	0.999 8	0.056	0.019
Emodin	$Y = 9.25 \times 10^7 X + 9.03 \times 10^6$	0.23–1.86	0.999 2	0.009	0.003
Physcion	$Y = 1.31 \times 10^6 X + 1.01 \times 10^4$	0.12–3.79	0.999 9	0.013	0.005
Phellodendrine*	$Y = 2.52 \times 10^6 X - 3.62 \times 10^5$	0.93–14.84	1.000 0	0.412	0.137
Calycosin-7-glucoside	$Y = 8.69 \times 10^7 X + 6.89 \times 10^5$	0.021–0.68	0.999 4	0.002	0.001
Berberine*	$Y = 1.48 \times 10^6 X + 1.37 \times 10^5$	1.30–83.00	0.999 9	1.297	0.432
β -Ecdysterone	$Y = 5.06 \times 10^6 X - 2.10 \times 10^4$	0.078–1.25	0.999 7	0.017	0.006
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	$Y = 6.39 \times 10^7 X - 5.83 \times 10^5$	0.020–0.64	0.999 3	0.020	0.007
Ginsenoside Re	$Y = 7.22 \times 10^7 X + 1.42 \times 10^5$	0.019–0.31	0.999 8	0.019	0.006
Ginsenoside Rg1	$Y = 9.80 \times 10^7 X + 2.56 \times 10^6$	0.78–1.24	0.999 6	0.009	0.003
Paeonol	$Y = 2.55 \times 10^7 X - 2.82 \times 10^5$	0.30–4.74	0.999 9	0.022	0.007
Icariin	$Y = 3.40 \times 10^5 X - 2.64 \times 10^4$	0.29–4.71	0.999 0	0.065	0.022
Nardosinone*	$Y = 0.83 \times 10^3 X + 0.61 \times 10^4$	1.02–32.60	0.999 4	1.019	0.340
Tenuifolin	$Y = 2.61 \times 10^7 X + 4.00 \times 10^4$	0.020–0.32	0.999 5	0.014	0.005
Ginsenoside Rb1	$Y = 1.90 \times 10^7 X - 3.07 \times 10^5$	0.060–0.94	0.999 8	0.059	0.020
Alisol C 23-acetate	$Y = 3.33 \times 10^7 X - 9.63 \times 10^4$	0.006 3–0.11	0.999 5	0.006	0.002
Osthole	$Y = 2.13 \times 10^8 X + 1.53 \times 10^7$	0.47–3.74	0.997 0	0.017	0.006
Astragaloside IV	$Y = 8.69 \times 10^8 X + 2.03 \times 10^6$	0.011–0.17	0.999 4	0.011	0.004
Alisol B 23-acetate	$Y = 1.33 \times 10^5 X + 0.56 \times 10^4$	0.081–1.30	0.999 9	0.081	0.027

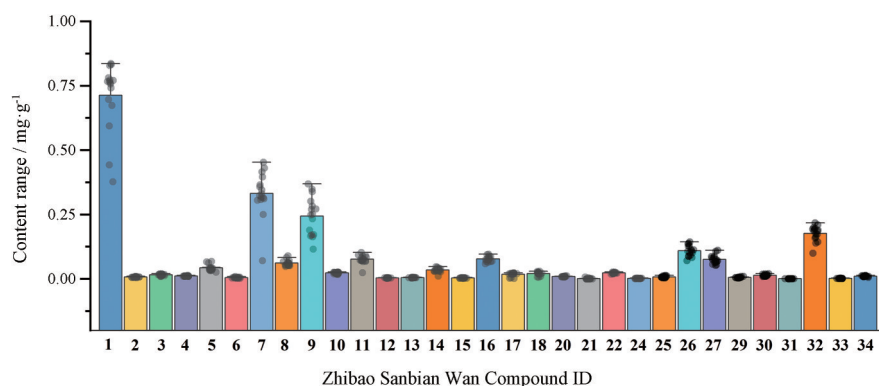


Figure 2 Mean contents of 34 compounds from 16 batches of Zhibao Sanbian Wan. See Table 1 for the name of each compound

聚类反映出普通制剂和精品制剂的含量存在差异。由主成分分析得到得分图、成分分子载荷矩阵信息及变量载荷图, 结果见图3B和3C, 可知第一主成分PC1能够反映全部变量信息的67.2%, 第二主成分PC2能够反映全部变量信息的15.7%, 前2个主成分反映的样品信息占全部信息的82.9%。从得分图可知, 精品制剂S16和普通制剂存在明显差异, 而普通制剂之间一致性尚可, 这和聚类分析的结果是一致的。从各成分载荷图可知, 主要是距离中心较远的小檗碱(21)影响了S16和其他样品的得分, 另外小檗碱(21)、人参皂苷Re(24)和人参皂苷Rg1(25)影响S1、S14批次样品的得分; 其他影响得分的成分还有莫诺苷(5)、松脂醇二葡萄糖苷(6)、松果菊苷(7)、细叶远志皂苷(29)、人参皂

苷Rb1(30)、23-乙酰泽泻醇C(31)等; 同时以上成分在普通制剂批间的变异也较大, 如RSD小檗碱为161.52%、人参皂苷Re为38.51%、人参皂苷Rg1为39.49%、松脂醇二葡萄糖苷为33.14%、细叶远志皂苷为35.03%, RSD均在30%以上。另外, 原儿茶酸(RSD 10.57%)、松果菊苷(RSD 15.73%)、毛蕊花糖苷(RSD 13.59%)、远志山酮III(RSD 15.92%)、 β -蜕皮甾酮(RSD 10.13%)、蛇床子素(RSD 12.52%)、23-乙酰泽泻醇B(RSD 15.68%)、甘草苷(RSD 13.57%)和甘草酸(RSD 14.13%)等的变异较小, RSD在16%以内, 含量较为稳定。

5 日用剂量及血浆-脑组织-脑脊液中移行成分分析
各化学成分按成人日用剂量排序结果见图4A, 日

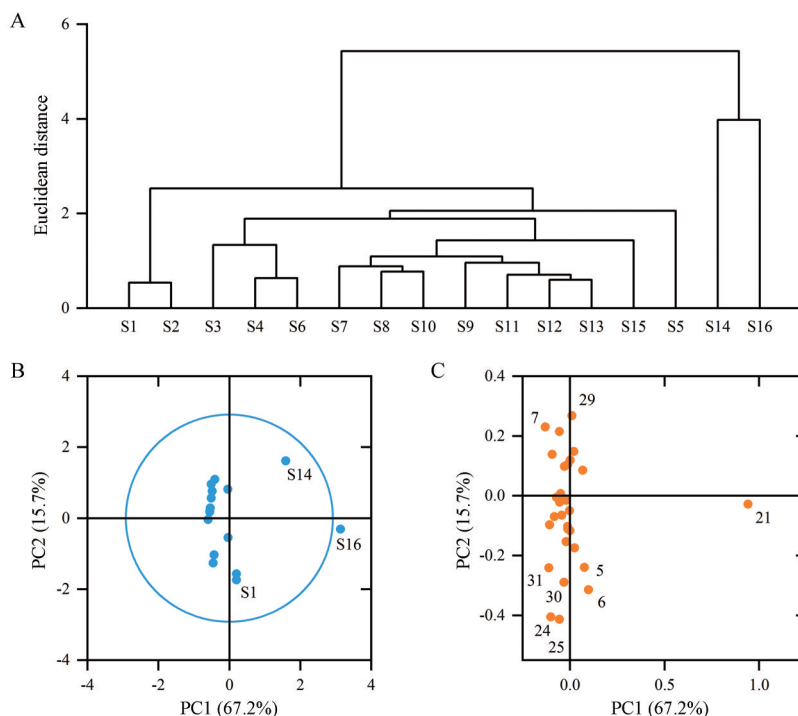


Figure 3 Systematic cluster analysis (A), principal component analysis score scatter plot (B) and loading scatter plot (C) results for 16 batches of Zhibao Sanbian Wan. See Table 1 for the name of each compound

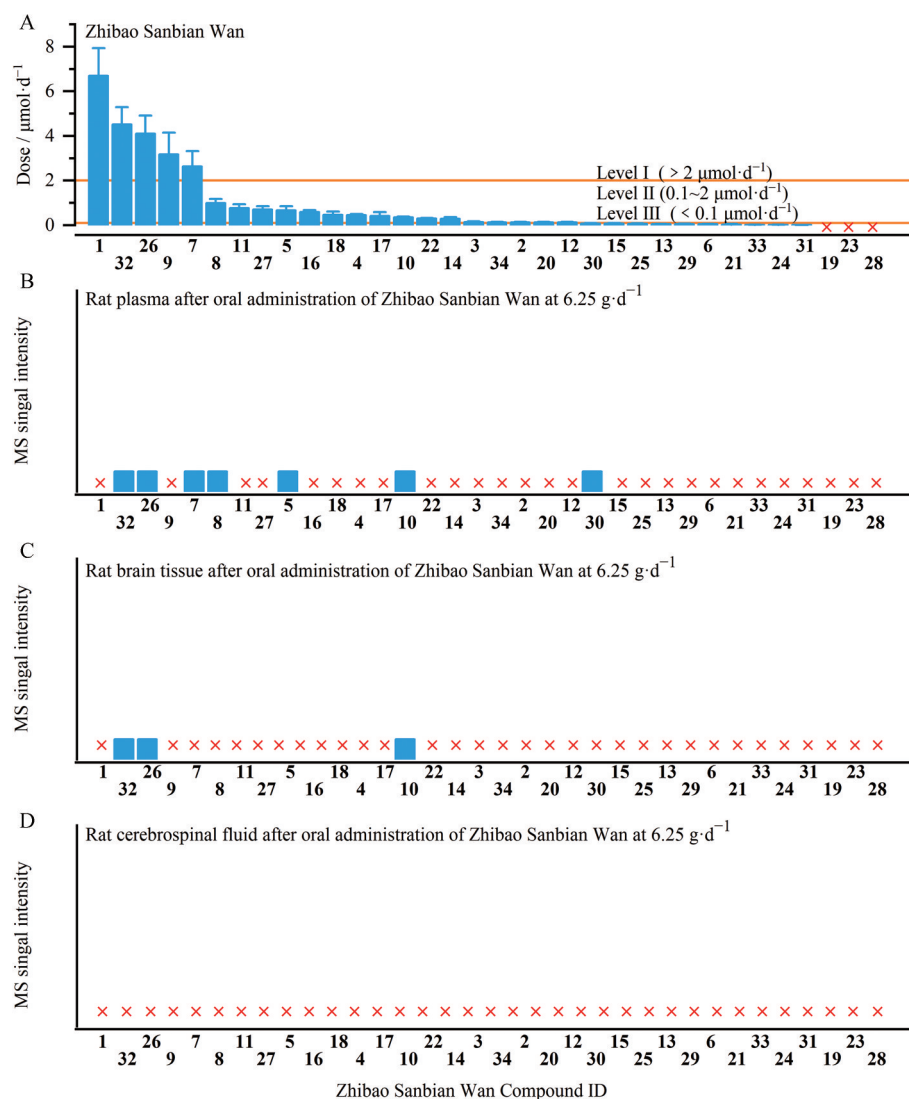


Figure 4 Mean doses of 34 compounds from 16 batches (A), migration component in rat plasma (B)-brain tissue (C)-cerebrospinal fluid (D) after oral administration of Zhibao Sanbian Wan at $6.25 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$. See Table 1 for the name of each compound

用剂量大于 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}$ 的有耐斯糖 ($6.69 \mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}$)、蛇床子素 ($4.52 \mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}$)、丹皮酚 ($4.10 \mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}$)、芍药苷 ($3.17 \mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}$) 和松果菊苷 ($2.63 \mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}$), 在 $0.1\sim 2 \mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}$ 之间的有马钱苷、莫诺苷、毛蕊花糖苷、淫羊藿苷、地黄苷 D 等, 人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1、细叶远志皂苷、黄芪甲苷等的日用剂量低于 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}$ 。使用和至宝三鞭丸制剂含量测定相同的检测方法, 即 HPLC-MS/MS 一法通用策略, 进行大鼠给药后血浆、脑组织和脑脊液中各成分的分析。通过和空白样品的比对, 发现大鼠血浆中有 7 种成分具有可定量的质谱信号, 分别为人参皂苷 Rb1、蛇床子素、丹皮酚、莫诺苷、马钱苷、甘草苷、松果菊苷, 说明这 7 种化学成分可被吸收入血, 结果见图 4B; 大鼠脑组织中有 3 种具有可定量的质谱信号, 分别为蛇床子素、丹皮酚、甘草苷, 说明这 3 种化学成分可通过血脑屏障进

入脑组织, 结果见图 4C; 而在脑脊液所监测的 34 成分中均未发现明显的质谱信号, 结果见图 4D。

讨论

对中药制剂中的主要化学成分进行定量研究, 是评价中药制剂一致性和进一步明确中药药效物质基础的必经阶段。定量指标的选择作者参考刘昌孝院士提出复方中药质量标志物“五原则”, 即“物质存在性”、“物质特有性”、“物质可测性”、中医药理论“物质功效关联性”和在产品生产过程中的“物质溯源性和传递性”的五大元素^[10]进行确定。首先依据药典中对单味药材或饮片控制的指标性成分, 并参考前期至宝三鞭丸定性鉴别的结果^[9], 以及相应的质谱信号强度, 筛选出 34 种化学成分进行含量测定, 符合“物质存在性”、“物质可测性”等原则。在这些成分中, 有些是至宝三

鞭丸所含药材的专属性成分,如淫羊藿苷、松脂醇二葡萄糖苷、黄芪甲苷、 β -蜕皮甾酮、远志山酮III和细叶远志皂、23-乙酰泽泻醇B和23-乙酰泽泻醇C分别来自淫羊藿、杜仲、黄芪、牛膝、远志、泽泻等药材,符合“物质特有性”等原则^[1]。并且,这34种化学成分源自至宝三鞭丸中至少21种药材,相对于单一药材或少量化学成分的含量测定方法^[11,12],本研究使用多组分的含量评价其制剂的一致性将更具客观性。

经过定量方法学的验证,建立了至宝三鞭丸中34种化学成分同时定量的HPLC-MS/MS分析方法,样品进样后在15 min之内即可完成全部化学成分的分离和检测。在所有16批次至宝三鞭丸制剂中,黄柏碱、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷和甘松新酮的浓度低于定量限,可能和其本身含量水平低(药典规定的限量标准黄柏、覆盆子和甘松中各成分含量分别为0.34%、0.03%和0.1%)、脂溶性高(黄柏碱和甘松新酮的Alog *P*分别为3.19和3.18)不易提取的化学性质有关^[13]。另外,建立的方法中各待测成分的检测限均比较低(0.000 14~0.030 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),结合化学成分的特征性离子、定量与定性离子比例和液相保留时间等HPLC、MS参数,将有助于实现这些成分的初步定性^[14],这也是一法通用策略应用的前提。至宝三鞭丸中所定量的31种化学成分的含量均小于1 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,含量总和约占1.58~2.44 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,这说明中药丸剂中化学成分含量的微量性,对这些成分的准确定量需要使用更高灵敏度的分析方法。所以,本研究使用HPLC-MS/MS建立多成分分析方法,兼具定量和定性的特点,用于评价至宝三鞭丸制剂具有一定的优势;另外,本方法具有灵敏度高、准确度高的特点,使用一法通用策略,可用于分析至宝三鞭丸向大鼠血浆、脑组织和脑脊液的转移情况。

中药丸剂中的赋形剂是其制剂特征形成的重要原因^[15],炼蜜是最常用的赋形剂之一,因此样品检测前需要选择合适的前处理和提取方法。中国药典中的丸剂前处理多采用研细的方法,笔者考察了直接研磨或加入硅藻土研磨的方法,结果和剪碎后振摇溶散的效果相差不大,但研磨时至宝三鞭丸容易结块,所以本研究使用剪碎和振摇溶散的前处理方法。在样品提取时,使用超声的方法,考察了提取溶剂为热水、25%甲醇、50%甲醇、75%甲醇和纯甲醇,提取时间为15、30、60 min的提取效果,结果使用75%甲醇、超声提取30 min后各成分基本不再变化。因此,本研究采用75%甲醇超声的供试品溶液制备方法。

系统聚类分析能将精品制剂和普通制剂明显区分,这也在一定程度上说明了本研究选择的多组分指

标具有一定的代表性。主成分分析结果表明,小檗碱、人参皂苷Re、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rb1、莫诺苷、松脂醇二葡萄糖苷、松果菊苷、细叶远志皂苷等化学成分有重要贡献,且松果菊苷(2.63 $\mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}$)和莫诺苷(0.66 $\mu\text{mol}\cdot\text{d}^{-1}$)的日用剂量在检测成分中属于中上等水平,这提示黄柏、人参、山茱萸、杜仲、肉苁蓉、远志等药材的质量能较大影响至宝三鞭丸制剂之间一致性的评价,在至宝三鞭丸制剂原料药的纳入和制备过程中,或可针对这些药材采取勾兑混批或制备半成品、成品的的方法,使最终不同批次产品间的化学成分接近一致。另外,原儿茶酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、远志山酮III、 β -蜕皮甾酮、蛇床子素、23-乙酰泽泻醇B、甘草苷和甘草酸在普通制剂之间的含量比较稳定,且原儿茶酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、 β -蜕皮甾酮、蛇床子素、23-乙酰泽泻醇B、甘草苷和甘草酸的日用剂量属于中等和中上等水平,或可作为至宝三鞭丸制剂质量一致性评价的指标。

一法通用策略是利用同一种分析方法对中药制剂过程、体内过程产生的不同样品进行识别比对,分析化学成分的传递规律^[7]。前期作者^[7]研究了黄连汤化学成分从药材-制剂-血浆中的传递规律,本研究则应用于制剂-血浆-脑组织-脑脊液的传递分析,结果所监测的34种化学成分有7种可转移至血浆,有3种可传递至脑组织,而脑脊液中未发现可定量的物质。至宝三鞭丸多用于脑功能疾病的治疗,而能进入血浆,特别是脑组织的药物成分很可能是其发挥直接药效的物质基础。如至宝三鞭丸中能入血的松果菊苷,具有如神经保护等作用^[16],其药理活性和全方功效相关,符合中医药理论“物质功效关联性”等原则。由于生物基质的不同,在质谱检测时可能会对目标分析物的信号起到增强或抑制的结果,所以后期对一法通用策略还需要进一步考察完善。

根据文献^[6-8]的设计,结合上述实验结果,初步研究确定至宝三鞭丸的定量“制剂质量标志物”有5类共31种,含量高的如耐斯糖、蛇床子素、丹皮酚、芍药苷和松果菊苷等;含量变异大的如小檗碱、人参皂苷Re、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rb1、莫诺苷、松脂醇二葡萄糖苷、细叶远志皂苷、23-乙酰泽泻醇C等;含量较为稳定的如原儿茶酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷、远志山酮III、 β -蜕皮甾酮、蛇床子素、23-乙酰泽泻醇B、甘草苷和甘草酸等;能入血入脑成分;其他类。但是由于本研究的局限性,尚未涉及海狗鞭、狗鞭、鹿鞭等“三鞭”中的成分检测,研究表明这些鞭类药材主要含核苷、氨基酸和脂肪酸等活性成分^[17],所以未来至宝三鞭丸的物质基础研究仍需进一步深入。

总之,本研究建立的34种化学成分的HPLC-MS/MS分析方法灵敏、准确、快速,可用于至宝三鞭丸多组分的同时定量研究、多批次制剂的含量一致性评价及制剂-血浆-脑组织-脑脊液的传递分析。上述方法和结果为至宝三鞭丸的物质基础、质量评价和控制的“制剂质量标志物”筛选提供了一定的数据和技术支撑,相关研究策略也将为其他中药丸剂的物质基础的定量研究提供思路参考。

作者贡献: 李涛、杜茂波共同讨论并设计了文章的整体构架;李涛、赵小亮、高文雅、焦玥和刘洋参与实施了实验方案,王志国、王官连、杜茂波参与了实验数据处理和分析;李涛、赵小亮、王官连、杜茂波完成了论文初稿与终稿的修改。

利益冲突: 所有作者均声明没有利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [2] Yin XB, Qu CH, Dong XX, et al. Preparation regularity of Chinese patent medicine in Chinese Pharmacopoeia (2020 edition, Vol I) [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 47: 4529-4535.
- [3] Wei ZY, Xu WJ, Liu J, et al. Simultaneous quantification and consistency analysis of 19 representative components in Longshengzhi Capsules by HPLC-QQQ/MS [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 44: 948-953.
- [4] Sun LL, Wang M, Ren XL. Application progress on chemical pattern recognition in quality control of Chinese materia medica [J] Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 4339-4345.
- [5] Ministry of Public Health of the People's Republic of China. Drug Standard of Ministry of Public Health of the People's Republic of China·Chinese Medicine Prescription Preparation Fifth Vol (中药成方制剂第五册) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1963.
- [6] Du MB, Li T, Shen S, et al. Screening of qualitative preparation quality markers of Yuliantang [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 101-109.
- [7] Li T, Zhao XL, Shen S, et al. Screening of quantitative preparation quality markers of Yulian Decoction [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 2728-2736.
- [8] Ran QS, Mu J, Li T, et al. Research of preparation quality markers of Yulian Tang with anti-inflammatory activity [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 47: 2947-2954.
- [9] Wang GL, Zhang YM, Gao WY, et al. Quality consistency of Zhibao Sanbian pills by HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2022, 22: 2403-2408.
- [10] Zhang TJ, Bai G, Liu CX. The concept, core theory and research methods of Chinese medicine quality markers [J]. Acta Pharm Sin (药理学学报), 2019, 54: 187-196.
- [11] Tian H, Bi JY. Quality study of exported Zhibao Sanbian Wan [J]. Qilu Pharm (山东医药工业), 2002, 21: 12-14.
- [12] Jiang HZ, Lin N. Determination of loganin in Zhibao San bian Wan [J]. Northwest Pharm J (西北药学杂志), 2011, 26: 31-33.
- [13] Ru JL, Li P, Wang JN, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- [14] Ru W, Li G, Seymour AB. High-throughput and multiplexed LC/MS/MRM method for targeted metabolomics [J]. Anal Chem, 2010, 82: 5527-5533.
- [15] Zhang Z, Gao TH, Fu CM, et al. Analysis on dosage form theory and current application situation of tradition Chinese medicine pill [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2017, 42: 2408-2412.
- [16] Zhao Q, Gao J, Li W, et al. Neurotrophic and neurorescue effects of echinacoside in the subacute MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. Brain Res, 2010, 1346: 224-236.
- [17] Dai TT, Gao XC, Wu HY, et al. Advance in chemical component and biological activity of the Chinese crude drugs of the Bian [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2014, 16: 1039-1042.