

基于指纹图谱和化学计量学的冠心七味片质量控制研究

刘成东^{1,2}, 杨利², 陈佳惠¹, 张彭鹏², 刘静¹, 张谦¹, 李君^{1*}, 王跃武^{1*}

(1. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古呼和浩特 010110; 2. 包头中药有限公司, 内蒙古包头 014040)

摘要: 本研究建立了冠心七味片的HPLC指纹图谱与化学计量学结合的多指标含量测定方法, 为其质量控制提供科学依据。采用Shim-pack GIST-HP C₁₈色谱柱建立18批冠心七味片的指纹图谱, 结合《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行全面分析; 采用聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)进行化学计量学研究, 并建立HPLC-MS/MS法同时测定9个成分含量。18批冠心七味片指纹图谱共标定了22个共有峰, 相似度为0.952~0.998, 9个共有峰被指认, 分别为1号峰没食子酸、3号峰原儿茶酸、8号峰鞣花酸、9号峰丹酚酸B、12号峰木犀草素、13号峰芹菜素、19号峰去氢二异丁香酚、20号峰隐丹参酮、21号峰丹参酮IIA; CA和PCA分析将18批冠心七味片聚为3大类: S1~S4(A厂家)聚为一类, S5~S8(B厂家)聚为一类, S9~S18(C、D厂家)聚为一类, 在OPLS-DA分析模式下, 以变量权重值(VIP) > 1为标准, 筛选出了14个质量差异物, 其均有不同的显著性差异; 9个成分在各自范围内线性关系良好, 线性相关系数 r 均 ≥ 0.999 ; 精密度的RSD均 $< 3.00\%$; 稳定性和重复性良好, RSD均 $< 5.00\%$; 平均加样回收率为96.58%~106.28%, RSD为2.68%~6.45%。此方法高效稳定, 可用于冠心七味片质量控制。

关键词: 冠心七味片; 指纹图谱; 化学计量学; 方差分析; 定量分析; 质量控制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)04-1115-09

Study on quality control of Guanxin Qiwei tablets based on fingerprint and chemometrics

LIU Cheng-dong^{1,2}, YANG Li², CHEN Jia-hui¹, ZHANG Peng-peng², LIU Jing¹, ZHANG Qian¹,
LI Jun^{1*}, WANG Yue-wu^{1*}

(1. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. Baotou Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Baotou 014040, China)

Abstract: The study aims to establish HPLC fingerprint and multi-index content determination method of Guanxin Qiwei tablets and provide scientific basis for its quality control. The fingerprints of 18 batches of Guanxin Qiwei tablets were established by Shim-pack GIST HP C₁₈ chromatographic column, and analyzed comprehensively in combination with the Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint (2012 edition). Cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used for stoichiometric study. HPLC-MS/MS method was established for simultaneous determination of 9 components. A total of 22 common peaks were identified in 18 batches of Guanxin Qiwei tablets fingerprint, and the similarity was 0.952–0.998, 9 common peaks were identified. They were No. 1 gallic acid, No. 3 protocatechuic acid, No. 8 ellagic acid, No. 9 salvianolic acid B, No. 12 luteolin, No. 13 apigenin, No. 19

收稿日期: 2024-10-17; 修回日期: 2025-02-13.

基金项目: 内蒙古自治区科技厅, 内蒙古自治区科技计划项目(2023YFHH0082); 内蒙古自治区蒙医药协同创新中心, 国际合作项目(MYYXT-GJ202306); 内蒙古自治区蒙医药协同创新中心, 成果转化培育项目(MYYXTPY202306); 内蒙古医科大学“致远”人才计划项目(ZY20242115); 内蒙古医科大学面上项目(YKD2024MS015).

*通讯作者 E-mail: nmg15547126231@sina.com; wywimmu@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1011

dehydrodiisoeugenol, No. 20 cryptotanshinone and No. 21 tanshinone IIA. CA and PCA analysis grouped 18 batches of Guanxin Qiwei tablets into 3 categories: S1-S4 (manufacturer A) was grouped into one category, S5-S8 (manufacturer B) was grouped into one category, and S9-S18 (manufacturer C and D) was grouped into one category. Under OPLS-DA analysis mode, 14 quality differentiators were selected with the variable important projection (VIP) greater than 1 as the standard, and all of them had significant differences. The linear relationship of the 9 components was good in their respective ranges, and the linear correlation coefficient r was greater than or equal to 0.099 9. Precision RSDs were all lower than 3.00%. The stability and repeatability were good, RSD lower than 5.00%; The average recoveries were 96.58%-106.28%, RSD was 2.68%-6.45%. This method is efficient and stable, and can be used for quality control of Guanxin Qiwei tablets.

Key words: Guanxin Qiwei tablet; fingerprint; chemometrics; analysis of variance; quantitative analysis; quality control

冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病, CHD)是由动脉粥样硬化导致冠状动脉狭窄,进而引起心肌缺血和坏死的疾病^[1]。近年来,CHD在全球范围内的发病率和死亡率持续上升,已对人类健康构成了严重威胁^[2]。CHD的治疗方法有心肌血运重建手术^[3],及时的手术治疗可以减轻CHD对心脏的损害,但无法完全恢复心肌结构^[4],因此,寻找一种药物治疗CHD非常重要和迫切的。随着我国传统医药的发展,其在医疗领域已经展现出独特的优势。蒙医将冠心病归为“心刺痛”范畴^[5],蒙医治疗“心刺痛”具有悠久的历史,经典方剂丰富,亟待进一步挖掘。

冠心七味片是治疗“心刺痛”的经典验方之一,该方由丹参、檀香、降香、山柰、肉豆蔻、广枣和沙棘七味药组成,具有活血化瘀、强心止痛功效,主要用于治疗冠心病、心绞痛、心烦心悸等疾病^[6]。方中丹参为主药,具有活血祛瘀、痛经止痛、清心除烦等功效^[7,8],现代研究表明丹参中丹酚酸B具有抗动脉粥样硬化和抗氧化等药理活性^[9],隐丹参酮则有抗缺血性心肌损伤和抑制炎症反应等药理活性^[10]。此外,方中檀香可行气止痛、降香化痰止血、山柰活血化瘀、肉豆蔻温中行气、广枣活血化瘀、沙棘活血散瘀^[11-16],诸药合用强化活血化瘀、强心止痛之功。此方为治疗CHD的良方。

目前关于冠心七味片的质量研究文献较为缺乏^[17,18],质量研究较为薄弱。中药指纹图谱在中药整体质量分析中已得到普遍认可和使用^[19]。化学计量学能够实现中药质量信息的标准化,并对中药质量信息进行全面把控^[20]。高效液相色谱-三重四级杆质谱(HPLC-MS)可采用多反应监测模式(MRM)分析,具有高灵敏度、高选择性和高效性等优势^[21]。基于此,本研究基于高效液相色谱(HPLC)技术建立18批冠心七味片指纹图谱与化学计量学分析结合HPLC-MS/MS法同时测定冠心七味片中没食子酸、原儿茶酸、鞣花酸、丹酚酸B、木犀草素、芹菜素、去氢二异丁香酚、隐

丹参酮、丹参酮II A等9个成分含量,旨在为该制剂质量控制提供参考。

材料与方法

仪器 LC-2030C Puls型高效液相色谱、LC-MS 8045 高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪,配备DGU-20A型脱气机,LC-20AD型输液泵、AUW120D十万分之一电子天平(日本岛津公司);BSA224S型万分之一天平(赛多利斯科学仪器有限公司);KQ5200E型超声波清洗器(广州博勒泰科有限公司)。

试剂 收集4个厂家18个批次冠心七味片,分别为A厂家(S1~S4,批号分别为06230701042、06230601002、06230701003、06230704040)、B厂家(S5~S8,批号分别为220640022、211002116、211002211、210121108)、C厂家(S9~S12,批号分别为22302016、22309003、22203011、22302019)、D厂家(S13~S18,批号分别为20210907、20210908、20210909、C24016、C24017、C24018),A、D厂家规格均为0.31 g/片、B厂家规格为0.3 g/片、C厂家规格为0.32 g/片;对照品没食子酸(批号:110831-202407,纯度 $\geq 98.6\%$)、原儿茶酸(批号:110809-202207,纯度 $\geq 98.2\%$)、鞣花酸(批号:111959-201903,纯度 $\geq 98.4\%$)、丹酚酸B(批号:111562-202318,纯度 $\geq 98.2\%$)、木犀草素(批号:111520-202107,纯度 $\geq 98.6\%$)、芹菜素(批号:111901-202205,纯度 $\geq 98.6\%$)、去氢二异丁香酚(批号:111838-201804,纯度 $\geq 98.4\%$)、隐丹参酮(批号:110852-201807,纯度 $\geq 99.2\%$)、丹参酮II A(批号:110776-202323,纯度 $\geq 99.6\%$)均来自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈(色谱纯,美国Thermo Fisher公司);磷酸(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);甲酸(质谱纯,上海起发生物科技有限公司);蒸馏水(屈臣氏中国有限公司)。

对照品溶液的制备 精密称取没食子酸3.21 mg、原儿茶酸2.44 mg、鞣花酸2.12 mg、丹酚酸B2.55 mg、

木犀草素 2.33 mg、芹菜素 3.16 mg、去氢二异丁香酚 3.00 mg、隐丹参酮 4.46 mg、丹参酮 II A 3.66 mg, 置于不同 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容, 即得 9 个对照品母液, 精密量取各母液适量置于同一 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 得质量浓度分别为 80.25、976.00、139.92、6885.00、209.70、259.12、390.00、1 873.20、1 464.00 ng·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。全部储存于 4 °C 条件下备用。

供试品溶液的制备 取冠心七味片适量研磨成粉, 称取约 0.500 g 置于 50 mL 锥形瓶中, 加 70% 甲醇 5 mL, 称量, 密封, 超声 45 min (频率 90 kHz), 待冷却室温, 70% 甲醇补重, 摇匀, 0.22 μm 有机滤膜过滤, 即得。

色谱条件 色谱柱为 Shim-pack GIST-HP C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 3 μm), 流动相为甲醇 (A)-0.2% 磷酸水溶液 (B), 流速为 0.80 mL·min⁻¹, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL, 检测波长为 254 nm; 梯度洗脱: 0~8 min, 15%→25% A; 8~23 min, 25%→38% A; 23~45 min, 38%→46% A; 45~65 min, 46%→48% A; 65~90 min, 48%→65% A; 90~110 min, 65%→80% A; 110~120 min, 80%→95% A; 120~130 min, 95%→15% A。

色谱-质谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 (A)-水 (含 0.1% 甲酸, B), 流速为 0.25 mL·min⁻¹, 柱温为 35 °C, 进样量为 3 μL; 梯度洗脱: 0~0.8 min, 5%~15% A; 0.8~1.5 min, 15%~25% A; 1.5~5.0 min, 25%~65% A; 5.0~6.0 min, 65%~75% A; 6.0~6.5 min, 75%~85% A; 6.5~7.0 min, 95% A; 7.0~8.0 min, 85%~10% A; 8.0~9.5 min, 5% A。质谱喷雾电压 3.80 kV (+)、3.50 kV (-), 雾化气体积流量 3 L·min⁻¹; 加热气体积流量 10 L·min⁻¹; 接口温度 300 °C; 脱溶剂温度 526 °C; 加热块温度 400 °C; 采用电喷雾离子源 (ESI); 正负离子扫描; 多重反应监测 (MRM) 模式; 正离子模式下的质谱参数: 去氢二异丁香酚 *m/z* 327.2→188.0, 碰撞能量-21.0 eV、隐丹参酮 *m/z* 297.1→251.1, 碰撞能量-24.0 eV、丹参酮 II A *m/z* 295.1→249.1, 碰撞能量-22.0 eV。负离子模式下的质谱参数: 没食子酸 *m/z* 168.9→125.0, 碰撞能量 15.0 eV、原儿茶酸 *m/z* 152.9→109.1, 碰撞能量 15.0 eV、鞣花酸 *m/z* 300.8→283.8, 碰撞能量 32.0 eV、丹酚酸 B *m/z* 716.9→519.3, 碰撞能量 21.0 eV、木犀草素 *m/z* 285.0→133.0, 碰撞能量 35.0 eV、芹菜素 *m/z* 260.1→117.0, 碰撞能量 34.0 eV。

指纹图谱方法学考察

精密度 取 S1 号样品 (批号: 06230701042), 按“供试品溶液的制备”项下制备供试品溶液。在“色谱条件”项下连续进样 6 次, 计算共有峰相对保留时间 RSD 和相对峰面积 RSD。

稳定性 取 S1 号样品, 按“供试品溶液的制备”项下制备供试品溶液, 在“色谱条件”项下, 于 0、3、6、12、18、24 h 进样分析, 计算共有峰相对保留时间 RSD 和相对峰面积 RSD。

重复性 取 S1 号样品 6 份, 按“供试品溶液的制备”项下制备供试品溶液, 在“色谱条件”项下, 计算共有峰相对保留时间 RSD 和相对峰面积 RSD。

化学计量学分析及统计学处理 化学计量学分析采用微生信平台和 SIMCA 14.1 软件。方差分析采用 GraphPad Prism 9.0 软件, $P < 0.05$ 定义为具有统计学差异, $P < 0.01$ 表示为具有显著性差异, $P < 0.001$ 表示为具有极显著性差异。

HPLC-MS 定量分析方法学考察

线性关系考察 分别精密量取混合对照品溶液 100、200、400、600、800、1 000 μL, 分别置于不同 1 mL 量瓶中, 甲醇定容, 在“色谱-质谱条件”项下进样。将对照品进样浓度设为横坐标 (X , ng·mL⁻¹), 峰面积设为纵坐标 (Y) 进行回归分析计算。

精密度 精密量取 400 μL 混合对照品溶液, 置于 1 mL 量瓶, 甲醇定容, 在“色谱-质谱条件”项下分别测定 6 次分析, 计算上述各成分峰面积 RSD。

稳定性 取 S1 号样品, 按“供试品溶液的制备”项下制备供试品溶液, 在“色谱-质谱条件”项下, 于 0、3、6、12、18、24 h 进样分析, 计算各成分峰面积 RSD。

重复性 取 S1 号样品 6 份, 按“供试品溶液的制备”项下制备供试品溶液, 在“色谱-质谱条件”项下分别进样分析, 计算上述各成分平均含量和 RSD。

加样回收 称取已知质量浓度 S1 号样品 6 份, 每份约 0.250 0 g, 以样品质量浓度约 100% 的比例加入对照品溶液。按“供试品溶液的制备”项下制备样品溶液。在“色谱-质谱条件”项下进样测定, 计算各成分平均加样回收率和 RSD。

结果

1 指纹图谱方法学考察

1.1 精密度 所得色谱图中, 3 号峰的响应度较高, 峰形优异。即以 3 号峰作为参照, 22 个共有峰相对保留时间 RSD 均 < 0.09%, 相对峰面积 RSD 均 < 2.61%, 表明仪器精密度良好。

1.2 稳定性 以 3 号峰为参照峰, 22 共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.04%, 相对峰面积 RSD 均 < 2.42%, 表明样品溶液 24 h 内具有良好稳定性。

1.3 重复性 以 3 号峰为参照峰, 22 共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 0.35%, 相对峰面积 RSD 均 < 2.92%, 表明该方法具有较好的重复性。

2 冠心七味片指纹图谱的建立及相似度分析

取4个厂家18批次样品,按“供试品溶液的制备”项下制备供试品溶液,在“色谱条件”项下连续进样分析。将所得色谱数据转为CDF格式,导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)。设S1号为参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度设为0.1 min,经过多点校正和Mark峰匹配,生成对照图谱R,得指纹图谱,如图1A所示,共标定22个共有峰。通过对照品母液色谱与S1号样品色谱比对,如图1B所示,9个色谱峰被指认,分别为1号峰没食子酸、3号峰原儿茶酸、8号峰鞣花酸、9号峰丹酚酸B、12号峰木犀草素、13号峰芹菜素、19号峰去氢二异丁香酚、20号峰隐丹参酮、21号峰丹参酮II A;相似度评价结果,18批冠心七味片样品相似度依次为0.986、0.965、0.982、0.952、0.985、0.980、0.981、0.983、0.997、0.994、0.990、0.996、0.995、0.995、0.998、0.993、0.996、0.996,相似度在0.952~0.998之间,表明样品具有良好的相似度,整体性良好;以原儿茶酸为参照峰,计算得到18批次样品22个共有峰相对峰面积RSD为21.85%~77.74%,表明18批样品在某些成分含量上存在差异。

3 化学计量学分析

3.1 聚类分析(CA) 利用微生信平台,以18批样品22个共有峰峰面积为指标,聚类方法采用complete法,距离度量设置为euclidean^[22],结果如图2,根据峰面积表达量可将18批样品聚为3大类,A厂家(S1~S4)聚为第1类,B厂家(S5~S8)聚为第2类,C、D厂家(S9~S18)聚为第3类,表明18批冠心七味片样品有质量差异。

3.2 主成分分析(PCA) 以22个共有峰峰面积为自变量,18个批次样品为因变量,导入SIMCA 14.1软件进行无监督判别的主成分分析,结果见图3,与CA分析结果一致,其中A、B厂家不同批次样品间离散性较小,C、D厂家不同批次样品间离散性较大,表明A、B厂家样品质量间较均一,C、D厂家样品间质量差异较大,亦验证了18批冠心七味片具有质量差异。

3.3 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA) 为排除无关变量对样品质量信息的影响,采用SIMCA 14.1软件有监督模式的OPLS-DA分析,模型参数 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 分别为0.805、0.717和0.667,均大于0.5,说明该模型预测能力和稳定性较好^[23],结果见图4A,再经200次

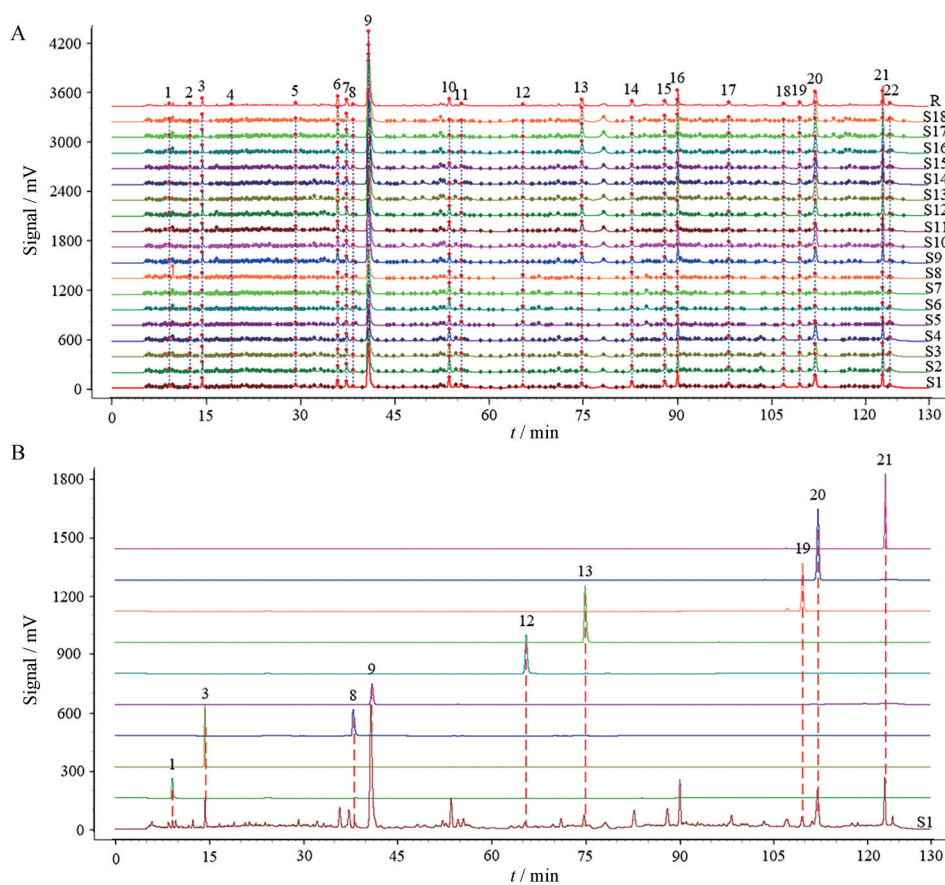


Figure 1 Fingerprints of 18 batches of Guanxin Qiwei tablets (A) and comparison of reference mother liquor with sample S1 chromatogram (B). 1: Gallic acid; 3: Protocatechuic acid; 8: Ellagic acid; 9: Salvianolic acid B; 12: Luteolin; 13: Apigenin; 19: Dehydroisoegenol; 20: Cryptotanshinone; 21: TanshinoneIIA; 2, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22: Other common peaks

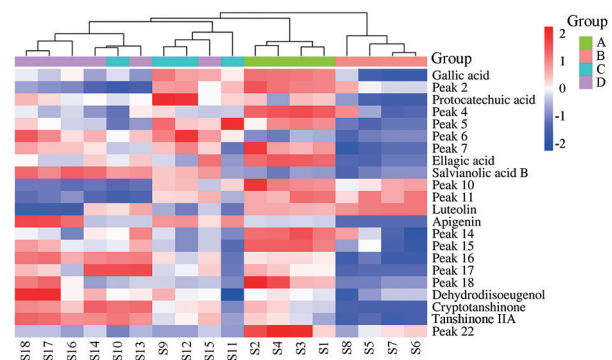


Figure 2 Cluster heat map analysis of 18 batches of Guanxin Qiwei tablets. Group A: Manufacturer A; Group B: Manufacturer B; Group C: Manufacturer C; Group D: Manufacturer D

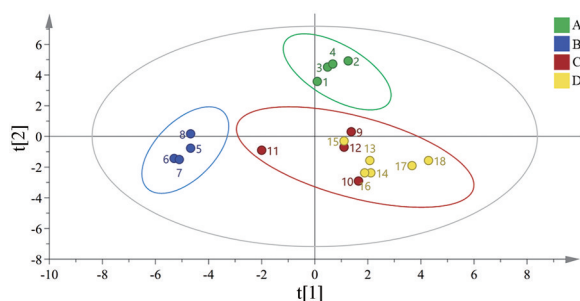


Figure 3 PCA score of 18 batches of Guanxin Qiwei tablets. A: Manufacturer A; B: Manufacturer B; C: Manufacturer C; D: Manufacturer D

置换检验, Q^2 回归线与纵轴的相交点小于0, 表明该模型有效, 无过度拟合^[24], 结果见图4B, OPLS-DA分析结果与CA和PCA分析结果相同, 但OPLS-DA分类结果更为明显, 进一步表明冠心七味片样品存在质量差异。

为筛选出导致样品间质量差异的主要成分, 以变量权重值 (VIP) > 1 为标准^[25]筛选出 14 个质量差异物, 如图4C所示, 分别为峰9 (丹酚酸B)、峰12 (丹参酮II A)、峰16、峰1 (没食子酸)、峰15、峰4、峰20 (隐丹参酮)、峰22、峰2、峰5、峰7、峰10、峰18、峰8 (鞣花酸), 即这 14 个成分是造成 18 批冠心七味片样品质量差异的主要来源。

3.4 质量差异物的方差分析 利用 OPLS-DA 分析中 VIP 值可筛选出样品间的质量差异物, 但无法判别样品间质量差异物是否具有统计学意义。因此, 根据以上 CA、PCA、OPLS-DA 分析结果, 将 18 批冠心七味片分为 3 类 (A、B 厂家分别为第 1 类和第 2 类, C、D 厂家共为第 3 类)。采用 GraphPad Prism 9.0 软件, 以 14 个质量差异物峰面积为指标, 进行单因素方差分析^[26], 结果如图 5 所示, 1 类中丹参酮 II A、峰 16、没食子酸、峰 15、峰 4、隐丹参酮、峰 22、峰 2、峰 5、峰 7、峰 18、鞣花酸

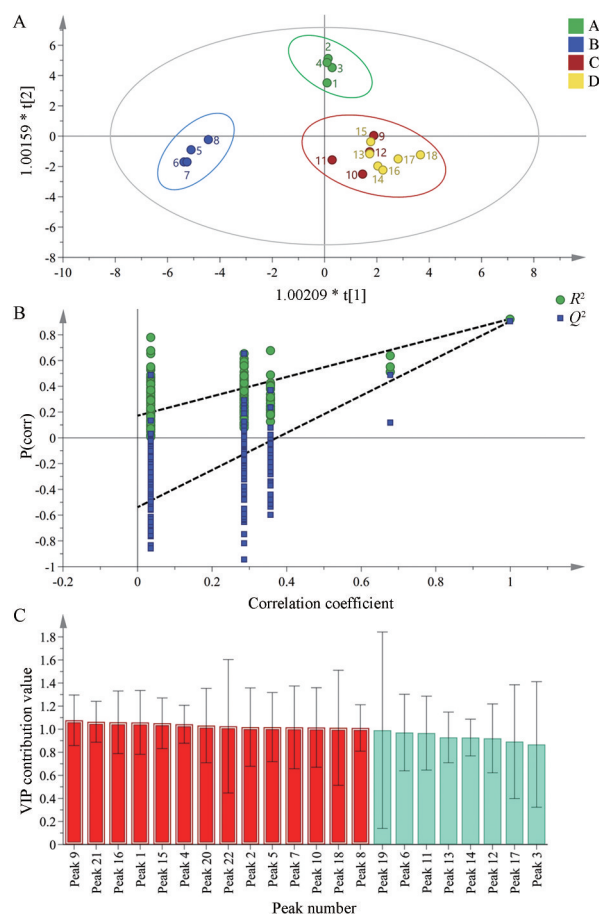


Figure 4 OPLS-DA score plot for 18 batches of Guanxin Qiwei tablets (A), OPLS-DA permutation test diagram (B) and VIP plot for 22 total peaks from 18 batches of Guanxin Qiwei tablet (C)

峰面积显著高于 2 类; 2 类中丹酚酸、丹参酮 II、峰 16、没食子酸、隐丹参酮、峰 2、峰 5、峰 7、鞣花酸峰面积显著低于 3 类, 而峰 2、峰 10 峰面积显著高于 3 类; 3 类中没食子酸、峰 15、峰 4、峰 22、峰 2、峰 10、峰 18、鞣花酸峰面积显著低于 1 类, 仅有丹酚酸 B 峰面积显著高于 3 类。上述各成分峰面积的相对显著性结果, 可能是造成 4 个厂家 18 批次冠心七味片分为 3 大类的�主要原因。

4 HPLC-MS 定量分析方法学考察

在上述色谱-质谱条件下, 各成分在 MRM 模式下的提取离子流色谱图见图 6。

4.1 线性关系考察 上述 9 个成分在各自范围内呈现良好线性关系, 线性相关系数 r 均 $\geq 0.999 0$, 结果见表 1。

4.2 精密度 上述 9 个成分峰面积 RSD 分别为 2.62%、0.90%、2.53%、1.95%、2.23%、2.55%、1.31%、0.79%、1.69%, 表明仪器精密度良好。

4.3 稳定性 上述 9 个成分峰面积 RSD 分别为 2.76%、2.62%、4.29%、1.66%、1.67%、1.22%、2.81%、1.56%、3.05%, 表明样品溶液 24 h 内具有良好稳定性。

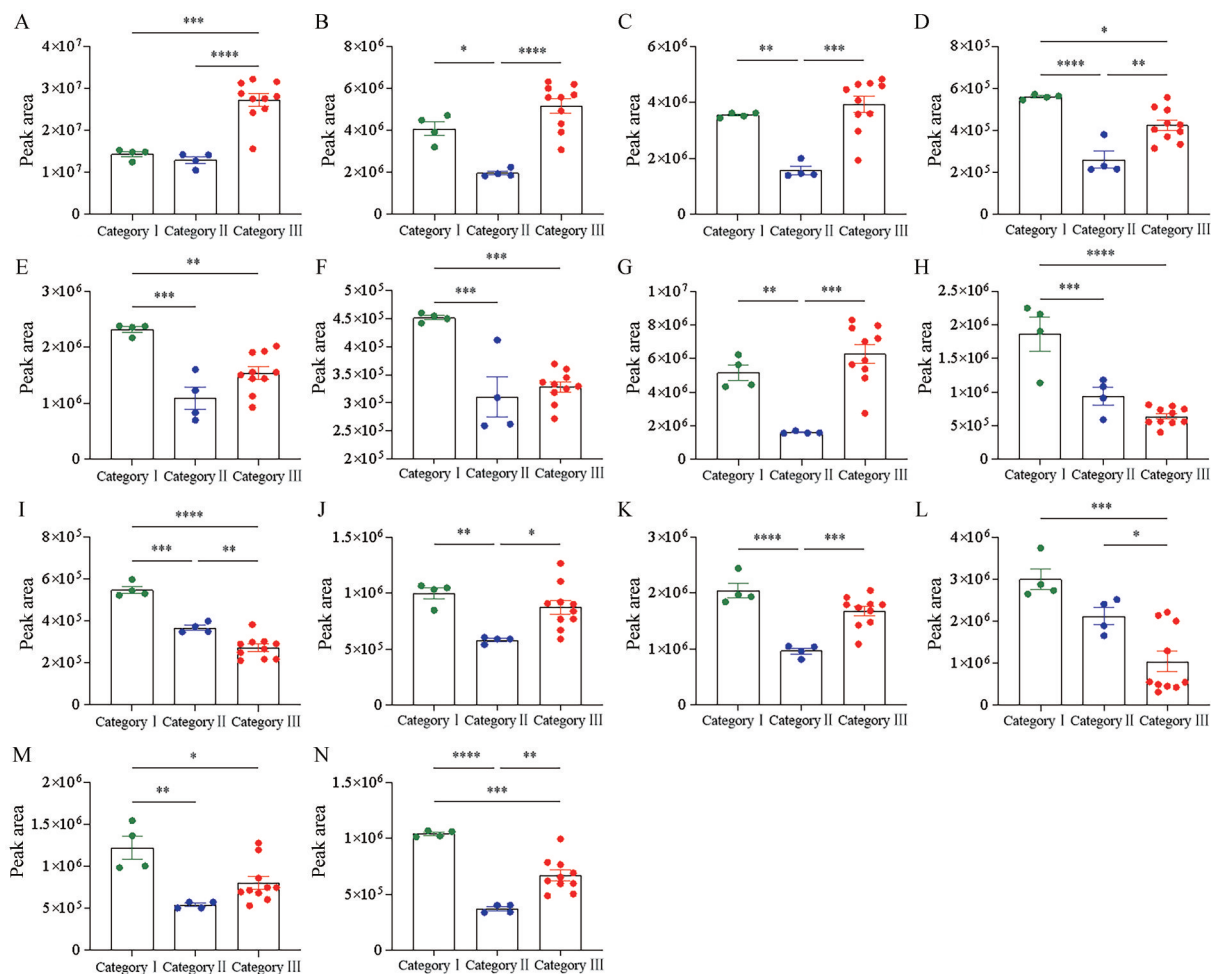


Figure 5 Analysis of variance of quality differentials. A: Salvianolic acid B; B: Tanshinone IIA; C: Peak 16; D: Gallic acid; E: Peak 15; F: Peak 4; G: Cryptotanshinone; H: Peak 22; I: Peak 2; J: Peak 5; K: Peak 7; L: Peak 10; M: Peak 18; N: Ellagic acid. $n = 18, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

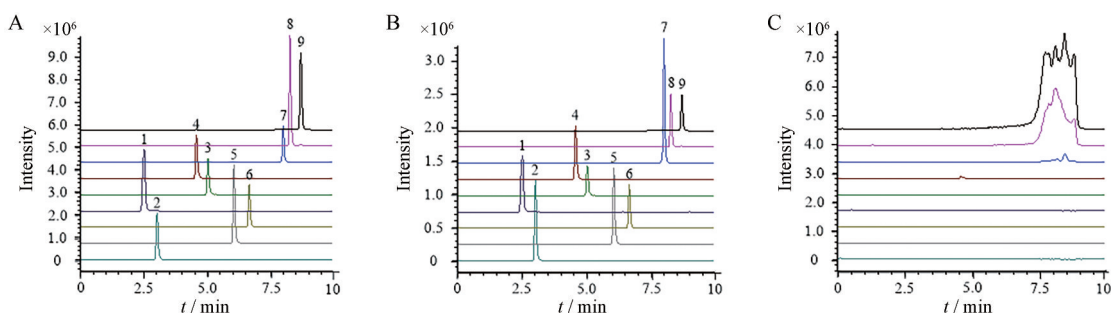


Figure 6 Extraction ion flow chromatogram of each component in MRM mode. A: Reference solution; B: Sample solution; C: Blank solution; 1: Gallic acid; 2: Protocatechuic acid; 3: Ellagic acid; 4: Salvianolic acid B; 5: Luteolin; 6: Apigenin; 7: Dehydrodiiisoeugenol; 8: Cryptotanshinone; 9: Tanshinone IIA

4.4 重复性 9个成分平均含量分别为2.991、28.294、4.078、412.490、6.076、3.248、15.714、167.948、139.360 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为3.27%、3.30%、2.68%、1.62%、1.87%、1.57%、1.75%、1.32%、2.19%,表明该方具有良好的重复性。

4.5 加样回收率 上述9个成分平均加样回收率分别为102.88%、96.98%、103.87%、101.07%、97.68%、

106.28%、96.58%、98.08%、97.73%, RSD 分别为3.07%、4.80%、4.38%、2.68%、3.12%、6.45%、3.14%、4.62%、4.59%。

4.6 样品含量测定 取18批冠心七味片样品,按“供试品溶液的制备”项下制备供试品溶液,稀释10倍,在“色谱-质谱”项下进样测定3次,计算上述9个成分平均含量,结果见表2。

Table 1 Results of linear relationship study on 9 components of Guanxin Qiwei tablets

Compound	Equation	<i>r</i>	Range/ng·mL ⁻¹	LOQ/ng·mL ⁻¹	LOD/ng·mL ⁻¹
Gallic acid	$Y = 4.961 \times 10^4 X + 4.036 \times 10^7$	0.999 4	8.025-80.25	0.095	0.031
Protocatechuic acid	$Y = 9.467 \times 10^3 X + 1.332 \times 10^6$	0.999 2	97.6-976	0.275	0.091
Ellagic acid	$Y = 6.520 \times 10^3 X + 1.640 \times 10^3$	0.999 0	13.992-139.92	0.275	0.091
Salvianolic acid B	$Y = 2.407 \times 10^3 X + 7.346 \times 10^6$	0.999 1	688.5-6 885	0.870	0.287
Luteolin	$Y = 3.989 \times 10^3 X + 4.212 \times 10^4$	0.999 3	187.32-1 873.2	0.193	0.064
Apigenin	$Y = 6.575 \times 10^3 X + 2.101 \times 10^3$	0.999 6	25.912-259.12	0.452	0.149
Dehydrodiisoeugenol	$Y = 5.615 \times 10^3 X + 1.801 \times 10^6$	0.999 4	39.0-390	0.029	0.010
Cryptotanshinone	$Y = 3.737 \times 10^4 X + 1.336 \times 10^7$	0.999 7	187.32-1 873.2	0.082	0.027
Tanshinone IIA	$Y = 3.011 \times 10^4 X + 1.426 \times 10^7$	0.999 4	146.4-1 464	0.394	0.130

Table 2 Determination of 9 components in 18 batches of Guanxin Qiwei tablets ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Sample No.	Gallic acid	Protocatechuic acid	Ellagic acid	Salvianolic acid B	Luteolin	Apigenin	Dehydrodiisoeugenol	Cryptotanshinone	Tanshinone IIA
S1	2.941	28.534	4.007	412.402	6.175	3.217	15.701	166.060	139.349
S2	2.967	34.382	3.955	417.903	5.743	3.064	11.265	169.940	142.438
S3	2.939	34.139	4.014	404.292	6.234	3.276	12.927	135.251	109.998
S4	3.230	15.405	3.970	412.994	6.458	3.135	11.367	162.645	117.271
S5	1.402	26.225	1.572	375.195	2.555	2.812	33.035	130.917	97.961
S6	1.459	17.371	1.494	374.257	2.863	2.942	36.943	140.704	99.027
S7	2.348	15.980	1.598	434.682	2.255	3.194	36.885	140.442	99.065
S8	1.362	30.352	1.565	359.978	2.418	2.799	26.680	145.028	93.083
S9	3.050	30.606	2.331	634.100	12.962	15.721	16.951	177.191	142.933
S10	2.799	13.116	2.332	579.439	13.231	13.932	13.789	159.237	131.985
S11	2.687	18.185	1.943	447.025	4.985	16.332	9.694	124.166	120.006
S12	2.655	29.319	2.569	559.121	9.448	14.513	12.962	171.727	140.115
S13	2.401	27.135	3.084	615.211	7.737	2.927	8.834	163.741	130.090
S14	2.361	26.027	4.038	549.642	7.162	2.813	9.775	165.463	128.718
S15	2.721	26.732	3.064	597.875	5.147	2.728	8.577	163.615	129.986
S16	1.800	14.875	2.949	612.730	6.981	9.492	5.909	111.250	112.538
S17	1.708	29.802	2.343	574.082	7.081	8.451	7.070	116.509	110.449
S18	2.003	32.172	3.043	603.768	6.991	8.426	6.315	113.972	101.227

讨论

为在指纹图谱实验中获得较高的色谱峰响应度、良好的分离度和峰形,前期考察了不同流动相(甲醇-0.2%磷酸水、乙腈-0.2%磷酸水)、洗脱时间(90、110、130 min)和流速(0.80、0.90、1.0 mL·min⁻¹)。最终确定,流动相为甲醇-0.2%磷酸水、洗脱时间为130 min、流速为0.80 mL·min⁻¹时效果最佳;在定量分析中,考察了不同流动相(甲醇-0.1%甲酸水、乙腈-0.1%甲酸水)对色谱峰的影响,最终选择甲醇-0.1%甲酸水作为流动相。在质谱检测模式的考察中,发现丹酚酸B在正负离子扫描模式下均能出峰,但在负离子模式下的响应度更高。通过相关文献^[27]发现去氢二异丁香酚具有三个定量离子,当定量离子为188时,峰形较优,响应度最高。为兼顾各成分的测定,本实验采用正负离子扫描和多反应监测模式进行定量分析。

本研究建立了HPLC指纹图谱,结合化学计量学对4个厂家18批冠心七味片样品进行质量研究。结果共标定了22个共有峰,其中9个共有峰被指认出,分别为没食子酸、原儿茶酸、鞣花酸、丹酚酸B、木犀草素、

芹菜素、去氢二异丁香酚、隐丹参酮、丹参酮II A。在相似度分析中,18个批样品相似度均在0.952以上,表明整体性良好,然而,以原儿茶酸为参照时,共有峰的相对峰面积RSD在21.85%~77.74%之间,表明某些成分含量存在较大差异。为进一步研究其质量差异,分别进行了CA、PCA和OPLS-DA分析,结果将样品分为3大类。为探究质量差异来源,在OPLS-DA分析模式下,以VIP>1为标准,筛选出了14个质量差异物,其中丹酚酸B、丹参酮II A、没食子酸、隐丹参酮、鞣花酸已被指认,由于在该制剂在《中华人民共和国卫生部药品标准》(蒙药分册)中除了制法、检查、用法用量项,尚无含量测定项,即这5个成分可作为其含量测定指标,且丹酚酸B、丹参酮II A和隐丹参酮均为主药丹参含量测定项中主要成分^[28],说明此指标作为该制剂的质量控制依据是合理的。由于无法确定14个质量差异物是否具有统计学意义,对其进行了单因素方差分析,结果显示,14个成分在3类样品之间均存在显著性差异,这些差异可能是导致冠心七味片质量差异的主要原因。

本研究对所指认的9个成分进行了定量分析。结果显示, 18批样品中丹酚酸B、丹参酮II A、没食子酸、隐丹参酮和鞣花酸的含量波动较大, 这可能是造成上述聚类现象的主要原因。根据相似度结果, A、B厂家样品的相似度分别在0.952~0.986和0.980~0.985之间, 而C、D厂家样品的相似度均在0.990以上, 与聚类结果相同, 也与不同厂家样品含量结果范围对应。此外, 丹酚酸B和丹参酮II A的平均含量最高, 可为临床用药的有效性和安全性提供参考依据。

综上所述, 本研究建立了冠心七味片指纹图谱与化学计量学分析结合HPLC-MS/MS法同时测定多成分的方法高效且稳定, 可用于冠心七味片的质量控制。

作者贡献: 杨利、陈佳惠、张彭鹏负责实验数据收集; 刘成东、刘静、张谦负责数据整理并撰写文章; 李君、王跃武负责文章修改。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

- [1] Wang X, Wang T, Wang Y, et al. Research progress on classical traditional Chinese medicine Taohong Siwu decoction in the treatment of coronary heart disease [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 152: 113249.
- [2] Cao L, Ni H, Gong X, et al. Chinese herbal medicines for coronary heart disease: clinical evidence, pharmacological mechanisms, and the interaction with gut microbiota [J]. Drugs, 2024, 84: 179-202.
- [3] Li MR, Cai YY, Yan ZM, et al. Treating recurrent angina pectoris after percutaneous coronary intervention based on Qi and blood vessels [J]. J Tradit Chin Med (中医杂志), 2024, 65: 1245-1248.
- [4] Laukkanen JA, Kunutsor SK. Revascularization versus medical therapy for the treatment of stable coronary artery disease: a meta-analysis of contemporary randomized controlled trials [J]. Int J Cardiol, 2021, 324: 13-21.
- [5] Li QF, Li XX, Hu HJ, et al. Retrospective analysis of 4524 inpatients using Mongolian medicine Anshen Buxin Liuwei Pill [J]. World Chin Med (世界中医药), 2024, 19: 1031-1037.
- [6] Liu CD, Guo JY, Li J, et al. Qualitative analysis of chemical constituents of Guanxin Qiwei tablets based on HPLC-Q-Exactive-MS technique [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2024, 22: 691-698.
- [7] Lai L, Jiang ZY, Feng YP, et al. Bioaccessibility analysis of active components in *Salvia miltiorrhiza* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 2435-2444.
- [8] Tan RH, Zhao W, Zhang JJ, et al. SmHPPR1 from *Salvia miltiorrhiza* regulated the biosynthesis of salvianolic acids [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 2818-2828.
- [9] Liu ZX, Xin GJ, You Y, et al. Mechanism of salvianolic acid B protecting H9C2 from OGD/R injury based on mitochondrial fission and fusion [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2024, 59: 374-381.
- [10] Li JL, Zhang L, Xin JY, et al. Research progress on pharmacological effects of cryptotanshinone and its novel preparation technology [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2024, 55: 4930-4938.
- [11] Du XD, Wang C, Guan ZH, et al. Exploration on the method of 'light treats excess' by YAO Wuda [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2024, 39: 2912-2915.
- [12] Yang L, Zeng YD, Zhang DY, et al. Study on the signature differential components of volatile oils from *Dalbergiae Odoriferae Lignum* and its adulterates [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2023, 46: 1969-1975.
- [13] Tian MY, Liu M, Han ZX, et al. Quality evaluation of Mongolian traditional medicine *Kaempferia* formula granules based on HPLC fingerprint and multi-component content determination combined with chemometrics [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2024, 22: 2969-2975.
- [14] Yang QC, Zhang QQ, Wang GQ, et al. Quantitative determination of 19 active components and optimization of extraction technology of Sishen Pills based on UPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2024, 55: 3679-3688.
- [15] Bao JP, Jin M, Yang YM, et al. *In vitro* effect of total flavones of *Fructus Chorspondiatis* on expression of collagen type I and type III mRNA and protein of cultured rat cardiac fibroblasts [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 136-141.
- [16] Yan CY, Ding ZJ, Li XM, et al. The chemical constituents and hypoglycemic activity of alcoholic extract of sea buckthorn leaves [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2023, 58: 396-404.
- [17] Wu YZ, Yang Y, Dong JN, et al. Determination of salvianolic acid A, gallic acid, protocatechuic acid and protocatechuic aldehyde Guanxin Qiwei Tablets [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2013, 35: 2418-2421.
- [18] Wu YH, Huang MQ, Li ZM, et al. Determination of tanshinone II A, tanshinone I, cryptotanshinone, and *trans*-ethyl-*p*-methoxycinnamate in Guanxin Qiwei Tablets by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2006, 28: 492-495.
- [19] Xie J, Tang Q, Zhang P, et al. Study on quality evaluation of Gegen Qinlian decoction based on UHPLC fingerprint and multi-component quantification [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2024, 59: 2365-2371.
- [20] Liu TL, Yang LL, Dong CM, et al. Study on HPLC fingerprint of *Lonicera Japonica* Flos from different areas based on chemical pattern recognition [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 4833-4843.
- [21] Sun S, Wang X, Gao L, et al. Simultaneous determination of 11 components in Hongwushen capsules by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2024, 44: 567-576.

- [22] Xu W, Gao BX, Qi JL, et al. Differential analysis of different origins and parts of *Cyathula officinalis* and its adulterants based on UPLC fingerprint coupled with chemical pattern recognition [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2024, 55: 5639-5648.
- [23] Yang S, Zheng L, Chi MY, et al. Simultaneous content determination of eighteen nucleosides and free amino acids in *Colla Corii Asini* by UPLC-MS/MS [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2024, 46: 2140-2146.
- [24] Liu SH, Zhang HY, Feng SM, et al. Quality evaluation of *Cynanchum stauntonii* by UPLC fingerprint combined with multi-component quantification and chemometrics [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2024, 55: 7837-7846.
- [25] Gong XJ, Peng L, Chen XY, et al. HPLC fingerprint and multi-components determination combined with chemical pattern recognition to evaluate quality of honeyed *Farfarae Flos* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2024, 55: 6344-6354.
- [26] Xiong LW, Huang WJ, Zhang LF, et al. Effects of different drying methods on phenolic acids and flavonoids of *Lonicerae Japonicae Flos* [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志)*, 2024, 39: 2444-2450.
- [27] Bu R, Zhang PP, Wang YW, et al. Simultaneous determination of fifteen constituents in Zhuriheng Dropping Pills by UPLC-MS/MS [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2023, 45: 3890-3894.
- [28] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典)* [S]. 2020 Ed. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 77.