

基于网络药理学和 HPLC-MS/MS 分析的参松养心胶囊药效物质筛选及含量测定

刘敏彦^{1,2}, 何敬宇^{1,2}, 何庆国³, 董岩^{1,2}, 张会欣^{1,2}, 苏红宁^{4*} (1. 石家庄学院, 河北省藏药质量技术创新中心, 石家庄 050035; 2. 石家庄市靶点药物研究与药效学评价重点实验室, 石家庄 050035; 3. 河北宇辰医药科技有限公司, 石家庄 050035; 4. 石家庄市第四医院, 石家庄 050011)

摘要:目的 本研究拟构建“成分-靶点-疾病”相关联的多维网络系统,发现参松养心胶囊中与功效相关的质量标志物,并以发现的质量标志物为评价指标,建立高效快速的含量测定方法。方法 采用网络药理学筛选的 20 种药效物质作为质量标志物,采用液质联用技术,多反应监测和正负离子切换分段检测模式进行含量测定;色谱柱为 Waters C₁₈ 色谱柱,流动相为体积分数 0.1% 甲酸水和乙腈,梯度洗脱,流速为 0.8 mL · min⁻¹。结果 根据网络药理学研究结果,选择贡献度较高的 20 种化合物作为质量标志物进行含量测定,方法学验证结果表明 20 种被测化合物在检测范围内均具有良好的线性关系($r^2 > 0.9911$),精密度、准确度和稳定性均良好。结论 本研究建立的方法简单、快速、准确可靠,能够用于参松养心胶囊的药效物质筛选和质量评价。

关键词: 网络药理学; 高效液相色谱串联质谱; 参松养心胶囊; 多反应监测; 正负离子转换模式

doi:10.11669/cpj.2024.02.006 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)02-0142-09

Screening and Determination of Effective Components in Shensong Yangxin Capsules Based on Network Pharmacology and HPLC-MS/MS Analysis

LIU Minyan^{1,2}, HE Jingyu^{1,2}, HE Qingguo³, DONG Yan^{1,2}, ZHANG Huixin^{1,2}, SU Hongning^{4*} (1. Hebei Tibetan Medicine Quality and Technology Innovation Center, Shijiazhuang University, Shijiazhuang 050035, China; 2. Shijiazhuang Key Laboratory of Target Drug Research and Pharmacodynamic Evaluation, Shijiazhuang 050035, China; 3. Hebei Yuchen Medical Technology Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China; 4. The Fourth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To construct a multi-dimensional network system of “component-target-disease”, find the quality markers related to the efficacy of Shensong Yangxin capsules, and establish an efficient and rapid determination method. **METHODS** The pharmacodynamic substances selected by network pharmacology were used as quality markers and a novel HPLC-ESI-MS/MS method was developed. During the development of the method, multiple-reaction monitoring scanning and a multi-periods program were applied for quantification by switching electrospray ion source polarity between positive and negative modes at appropriate time points in a single run. Chromatographic separation was performed on a Waters C₁₈ column with linear gradient elution of 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile at a flow rate of 0.8 mL · min⁻¹. **RESULTS** According to the results of network pharmacology, twenty compounds with high contribution were selected as quality markers for content determination. The results of methodological verification showed that all calibration curves had good linearity ($r^2 > 0.9911$) within the test ranges. The precision, accuracy and stability of the method were all satisfying. **CONCLUSION** The analytical method is simple, rapid, specific and reliable, which is useful for pharmacodynamic substance screening and comprehensive quality evaluation of Shensong Yangxin capsules.

KEY WORDS: network pharmacology; HPLC-MS/MS; Shensong Yangxin capsule; MRM; polarity switching technology

参松养心胶囊(SSYX)是由人参、麦冬、丹参、山茱萸及黄连等 12 味中药组成的复方制剂,于 2003 年在国内批准上市,具有益气养阴、活血通络、清心安神的功效。药理学研究表明^[1-5],参松养心胶囊能

改善垂体后素致实验性大鼠心肌缺血,改善大鼠心肌缺血/再灌注后室性心律失常,保护心肌梗死模型大鼠心肌细胞,减轻代谢综合征引起的房颤,通过对心肌细胞 Na⁺、K⁺、Ca²⁺ 等多离子通道的调节,对快

基金项目: 河北省自然科学基金项目资助(H2022106048);石家庄学院博士科研启动基金项目资助(22BS001)

作者简介: 刘敏彦,女,博士 研究方向:药物分析及药效物质基础研究 * **通讯作者:** 苏红宁,女,副主任中药师 研究方向:药物分析及药效物质基础研究 Tel:(0311) 89927113

速心房起搏的家兔发挥抗房颤作用。临床试验证实^[6-8],参松养心胶囊能够改善窦性心动过缓伴室性早搏和突发性心动过缓,有效治疗心房颤动,被广泛应用于多种心血管疾病的治疗。

参松养心胶囊化学成分复杂,已有文献报道^[9-11],采用高效液相色谱法(HPLC)或超高效液相色谱法(UPLC)测定参松养心胶囊中的人参皂苷 Rb1,芍药苷,马钱苷,丹酚酸 B,盐酸小檗碱和五味子甲素等主要成分的含量。对于有着几十甚至几百种生物活性成分的中药复方制剂而言,简单地定量几种成分显然不足以保证参松养心胶囊的有效性和安全性,达到全面控制其质量的目的,而且目前的质量控制指标的选择未能很好地与功效相关联,揭示药物与疾病、靶点之间的关联性。近年来,利用液相色谱-质谱(LC-MS)、气相色谱-质谱(GC-MS)等对活性成分进行定量测定,从单一指标到多指标,并结合指纹图谱和药效关系的研究都已经有了很大的进展^[12-13]。因此,本研究基于网络药理学的方法,发现参松养心胶囊治疗心律失常的靶点蛋白网络,建立了“成分-靶点-疾病”相关联的多维网络系统,基于中药“多因微效”的作用特点,依据参松养心胶囊中组分对药效的贡献度,预测了参松养心胶囊的药效物质,并运用液质联用技术,采用电喷雾离子源(ESI)、多反应检测、正负离子切换分段检测模式,同时定性定量测定参松养心胶囊中的20种活性成分,该方法简单快速、准确可靠,为参松养心胶囊的质量评价体系的完善提供了参考。

1 仪器和材料

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(包括真空脱气装置,四元输液泵,柱温箱,自动进样器,美国 Agilent 公司);3200 QTRAP™ 三重四级杆线性离子阱串联质谱仪,配有电喷雾离子化源(ESI 源),Analyst Software 数据系统(Version 1.5.2,美国 AB SCIEX 公司);超声波清洗器(KQ-300VDB,功率 300W,昆山市超声仪器有限公司);分析天平(AG135,瑞士 METTLER TOLEDO 公司)。

盐酸小檗碱、马钱苷、莫诺苷、芍药苷、斯皮诺素、槲皮素、丹酚酸 B、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rf、人参皂苷 Rg1、三七皂苷 R1、五味子甲素、五味子醇甲和五味子酯甲(中国食品药品检定研究院);小檗红碱、表小檗碱、丹酚酸 A、人参皂苷 Rd 和人参皂苷 Rg2(成都曼斯特生物工程有限

公司)。

乙腈、甲酸(色谱纯);甲醇为分析纯,纯净水(自制);参松养心胶囊(北京以岭药业有限公司)。

2 实验方法

2.1 网络药理学的分析及药效物质筛选

前期研究共鉴定了参松养心胶囊 99 个化学成分^[14],利用 Swiss Target Prediction 数据库和 BATMAN 数据库获得化学成分作用的靶点,通过 OMIM、TTD (Therapeutic Target Database)、Drugbank、DisgeNET 和 GeneCards 数据库,以“Ventricular Arrhythmia”“Ventricular Premature Beat”和“Atrial fibrillation”为关键词,搜索与室性心律失常、室性早搏和房颤有关的靶点,利用 VENNY 软件将成分靶点与疾病靶点进行交集得到共有靶点,利用 Cytoscape 3.7.1 软件,寻找核心靶点,反推与核心靶点对应的活性化合物,同时构建“药材-成分-靶点-疾病”多维网络图,并分析筛选药效物质。

2.2 关键药效物质分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)和体积分数 0.1% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 5 min, 20% ~ 25% A; 5 ~ 15 min, 25% ~ 95% A; 15 ~ 21 min, 95% A),平衡色谱柱 6 min,流速为 0.8 mL · min⁻¹。柱温为 25 °C。进样体积为 10 μL。

2.2.2 质谱条件 离子源为 ESI,采用正负离子扫描模式,正负离子喷雾电压(IS)分别为 5 500 kV 和 -4 500 kV,雾化温度为 650 °C,雾化气压(GS1, N₂)为 413.7 kPa,辅助气压(GS2, N₂)为 448.2 kPa,气帘气压(CUR, N₂)为 172.4 kPa,入口电压(EP)分别为 10.0/-10.0 V,出口碰撞能量(CXP)分别为 3.0/-5.0 V。采用多重反应监测(MRM)模式检测,测定过程划分为 5 个阶段(0.0 ~ 10.21 min:采用正离子模式检测小檗红碱、表小檗碱、小檗碱、马钱苷、芍药苷、莫诺苷和斯皮诺素 7 种化合物;10.21 ~ 10.24 min,正离子模式转换成负离子模式;10.24 ~ 14.24 min:负离子模式下检测槲皮素、丹酚酸 A、丹酚酸 B、人参皂苷 Rb1、Rd、Re、Rf、Rg1、Rg2 和三七皂苷 R1;14.24 ~ 14.27 min:负离子模式转换成正离子模式;14.27 ~ 21 min:正离子模式下检测五味子甲素、五味子醇甲、五味子酯甲)。驻留时间(dwelling time)为 60 ms。仪器控制和数据采集采用 Analyst 1.5.2 软件。待测定化合物的质谱信息见表 1。

表 1 参松养心胶囊中待测化合物的质谱信息

Tab. 1 Mass parameters of the analytes in Shensong Yangxin capsules (SSYX)

No.	Analyte	Mr	t _R /min	Selected ion	MS1	MS2	DP/V	CE/V
1	Berberastine	322	8.44	[M] ⁺	322.1	307.1	48	39
2	Berberine	336	9.55	[M] ⁺	336.1	320.1	52	45
3	Epiberberine	336	6.99	[M] ⁺	336.1	320.1	52	45
4	Loganin	390	4.56	[M + NH ₄] ⁺	408.2	229.1	30	12
5	Morroneiside	406	3.96	[M + NH ₄] ⁺	424.2	227.1	26	18
6	Paeoniflorin	480	7.19	[M + NH ₄] ⁺	498.4	179.0	20	20
7	Spinosin	608	6.88	[M + H] ⁺	609.2	327.2	60	30
8	Quercetin	302	10.47	[M - H] ⁻	301.0	150.9	-55	-22
9	Salvianolic acid A	494	12.09	[M - H] ⁻	492.9	295.0	-80	-23
10	Salvianolic acid B	718	12.50	[M - H] ⁻	717.1	519.1	-60	-30
11	Ginsenoside Rb1	1 109	11.75	[M - H] ⁻	1 107.7	88.9	-95	-100
12	Ginsenoside Rd	947	12.57	[M - H] ⁻	945.6	88.9	-110	-85
13	Ginsenoside Re	947	10.73	[M - H] ⁻	945.6	88.9	-110	-85
14	Ginsenoside Rf	801	12.21	[M - H] ⁻	799.5	59.0	-100	-100
15	Ginsenoside Rg1	801	10.76	[M - H] ⁻	799.5	59.0	-100	-100
16	Ginsenoside Rg2	785	12.64	[M - H] ⁻	783.6	475.4	-100	-100
17	Notoginsenoside R1	933	10.49	[M - H] ⁻	931.7	59.0	-100	-95
18	Deoxyschizandrin	416	20.03	[M + H] ⁺	417.2	316.2	46	34
19	Schisandrol A	432	16.16	[M + H] ⁺	433.2	415.0	20	10
20	Schisantherin A	536	18.15	[M + H] ⁺	537.2	415.2	30	15

2.3 溶液的制备

2.3.1 供试品溶液的制备 称取参松养心胶囊内容物研细,取约 0.2 g,精密称定,置于 50 mL 的量瓶中,加甲醇超声处理 30 min,放置室温,用甲醇补足至刻度,取上层清液,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.3.2 对照品溶液的制备 分别取待测 20 种化合物对照品适量,精密称定,分别加甲醇制备为单一对照品储备液;再精密取各单一对照品储备液适量,加甲醇稀释,制备得工作对照品混合溶液。

3 结果

3.1 网络药理学分析及药效物质筛选结果

依据已鉴定的化合物,预测了 92 种化合物作用靶点 846 个,以“Ventricular Arrhythmia”“Ventricular Premature Beat”和“Atrial fibrillation”为关键词,检索到与心律失常相关的疾病靶点 1 185 个,成分靶点与疾病靶点取交集得到 199 个共有靶点(图 1)。再利用 STRING 11.5 和 Cytoscape 3.7.1 得到 15 个核心靶点(图 2)。将核心靶点反推得到相关联的化合物共 67 种,将 67 种化合物与 15 个核心靶点导入 Cytoscape 3.7.1 中,构建“药材-成分-靶点-疾病”相关联的多维网络图(图 3)。基于成分可测性、对照品可获得性原则,选择度值较高的 20 种化合物作为参松养心胶囊的药效物质,并对其进行质量控制。

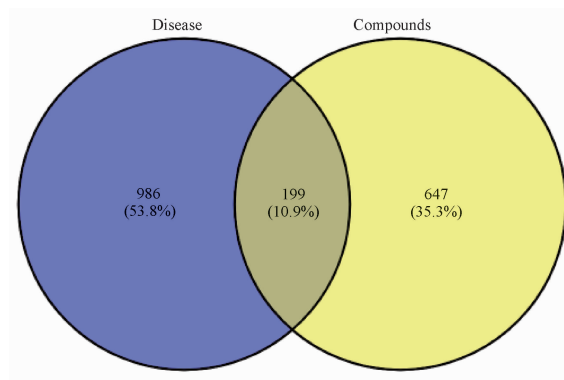


图 1 参松养心胶囊中化合物与疾病共有靶点图

Fig. 1 Common targets plot for compounds of SSYX and disease

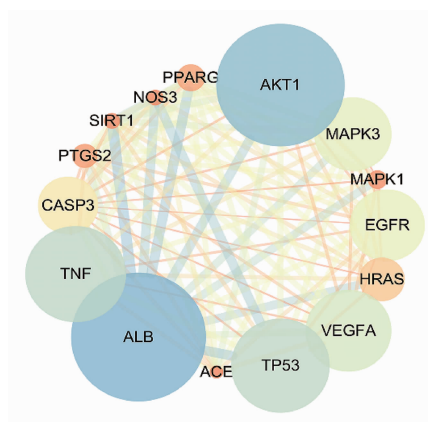


图 2 参松养心胶囊核心靶点图

Fig. 2 Network of core targets of SSYX

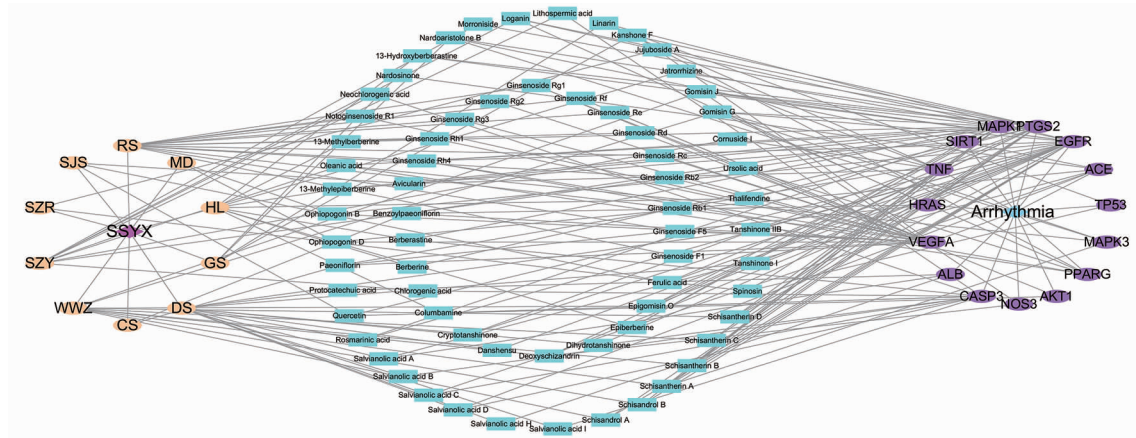


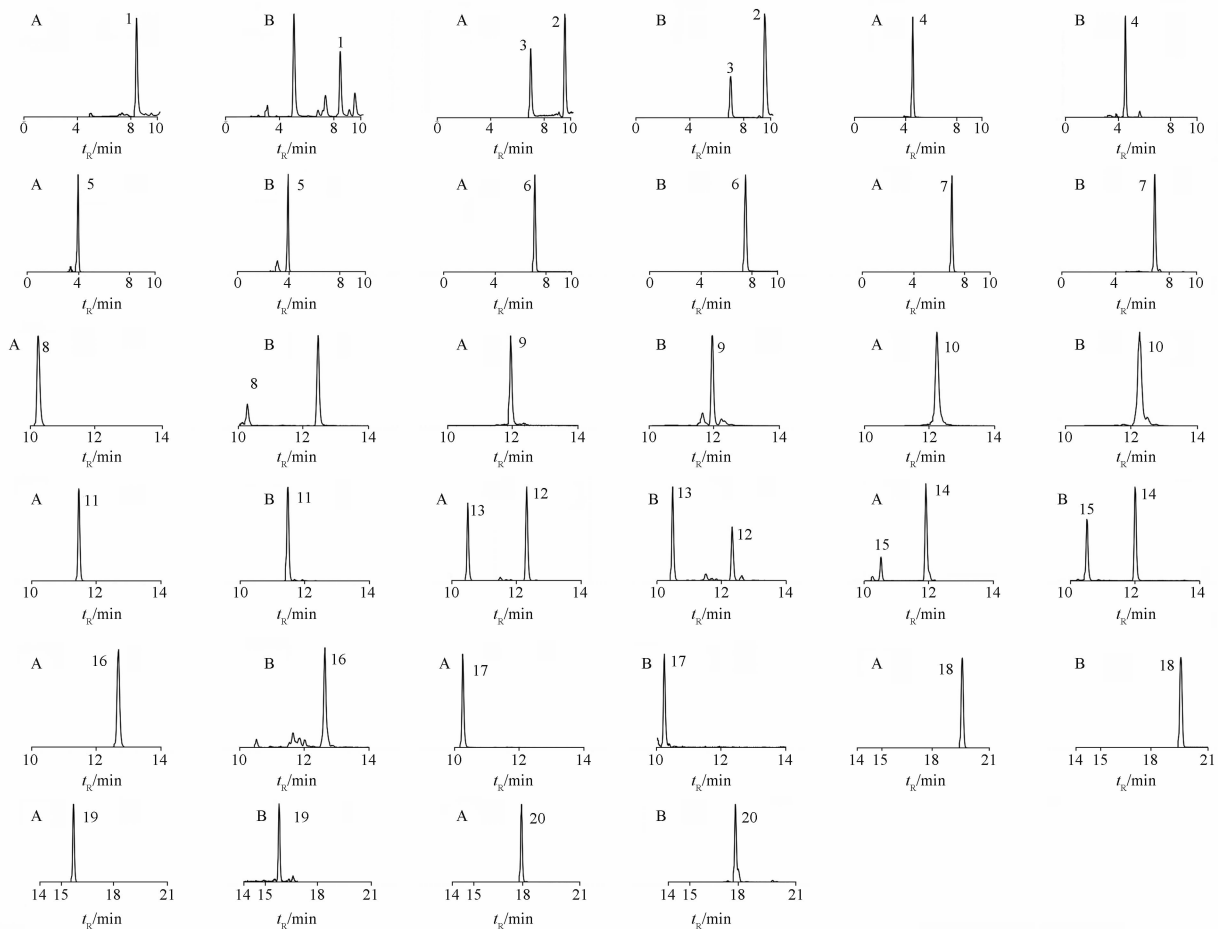
图3 参松养心胶囊治疗心律失常的药材-成分-靶点-疾病网络图

Fig. 3 The "herb-component-target-disease" network of SSYX in the treatment of arrhythmia

3.2 分析方法的验证

3.2.1 目标化合物的识别 准确识别每个目标化合物是成功定量的关键。在本实验中,应用多离子反应监测-信息依赖-增强子离子(MRM-IDA-EPI)扫描方式,获得待测化合物的碎片信息和色谱峰的保留时间,并与对照品溶液获得信息进行对比,确证被测化合物。在上述条件下获得的对照品的碎片裂解信息,与文献[14]报道一致。提取离子图谱见图4。

描方式,获得待测化合物的碎片信息和色谱峰的保留时间,并与对照品溶液获得信息进行对比,确证被测化合物。在上述条件下获得的对照品的碎片裂解信息,与文献[14]报道一致。提取离子图谱见图4。



A - 对照品; B - 供试品。

A - reference substances; B - test sample.

图4 参松养心胶囊待测化合物提取离子图

Fig. 4 Representative extracted ion chromatograms of the analytes in SSYX

3.2.2 基质效应 本实验采用标准加入的方法,考察基质效应,具体程序:将参松养心胶囊样品按照上述样品制备的方法进行提取,25 mL 参松养心提取液中加入对照品,另取 25 mL 用甲醇稀释 1 倍,基质效应按照公式 1 进行计算。

$$ME(\%) = (A - B) / C \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

式中,ME 代表基质效应,A、B 分别表示加入对照品的样品和加入稀释剂的样品的对应峰面积,C 表示在相同浓度下标准甲醇溶液的峰面积。结果显示,基质效应在 92.36% ~ 110.14%,表明该实验没有明显的基质效应出现。

3.2.3 线性关系考察、检测限和定量限 分别精

密吸取 20 种待测化合物的工作对照品混合溶液,用甲醇进行梯度稀释,制得系列混合对照品溶液,按确定的色谱条件和质谱条件进样测定,分别以待测化合物浓度(X)为横坐标,峰面积积分值(Y)为纵坐标进行线性回归,绘制标准曲线。结果各待测成分在测定的范围内具有良好的线性关系,相关系数($r^2 > 0.991$),测定结果见表 2。将混合对照品溶液进一步稀释,考察检测限和定量限,以信噪比 3:1 为检测限,信噪比 10:1 为定量限。结果见表 2,20 种待测物的检出限和定量限分别低于 $26.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $132 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,表明在上述检测条件下,具有较高灵敏度。

表 2 参松养心胶囊中待测化合物的线性关系、检测限和定量限结果

Tab. 2 The linearity, LODs and LOQs of the analytes in SSSYX

Analyte	Regression equation	Concentration range/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	r^2	LOD/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	LOQ/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
Berberastine	$Y = 4.09e^6X + 7.24e^3$	0.047-1.52	0.994 2	1.88	9.40
Berberine	$Y = 7.5e^6X + 3.27e^4$	2.43-38.92	0.991 2	3.80	19.0
Epiberberine	$Y = 5.19e^6X + 2.52e^4$	0.108-13.78	0.991 1	4.32	21.6
Loganin	$Y = 5.21e^4X - 186$	0.110-28.08	0.997 5	5.50	27.5
Morrinoside	$Y = 3.92e^4X - 199$	0.132-33.68	0.997 8	5.28	26.4
Paeoniflorin	$Y = 5.9e^4X - 31.3$	0.422-27.0	0.996 8	2.64	13.2
Spinosin	$Y = 5.47e^4X - 8.74$	0.051-13.12	0.998 9	1.02	5.10
Quercetin	$Y = 1.32e^4X - 50$	0.053-6.79	0.995 7	5.30	26.5
Salvianolic acid A	$Y = 4.89e^4X - 610$	3.11-49.68	0.996 5	19.4	97.2
Salvianolic acid B	$Y = 1.69e^4X - 162$	2.12-33.92	0.994 6	26.5	132
Ginsenoside Rb1	$Y = 2.08e^4X - 82.8$	0.102-26.2	0.993 0	2.04	10.2
Ginsenoside Rd	$Y = 3.33e^4X + 70.3$	0.105-6.74	0.995 5	2.10	10.5
Ginsenoside Re	$Y = 2.28e^4X - 52.7$	0.054-6.87	0.997 4	2.16	10.8
Ginsenoside Rf	$Y = 1.28e^5X - 273$	0.073-9.31	0.997 8	2.92	14.6
Ginsenoside Rg1	$Y = 3.56e^4X - 84$	0.112-7.17	0.992 5	2.24	11.2
Ginsenoside Rg2	$Y = 1.95e^5X - 118$	0.061-1.94	0.997 9	2.44	12.2
Notoginsenoside R1	$Y = 5.55e^4X + 111$	0.056-7.14	0.997 6	2.24	11.2
Deoxyshizandrin	$Y = 3.2e^6X - 415$	0.110-28.12	0.998 2	0.55	2.75
Schisandrol A	$Y = 4.59e^5X - 145$	0.013-1.61	0.997 3	0.52	2.60
Schisantherin A	$Y = 4.55e^4X + 128$	0.114-29.24	0.993 0	1.14	5.70

3.2.4 精密度 取同一批参松养心胶囊样品,精密称取 6 份,按“2.3.1”项下供试品溶液的制备方法,制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件和“2.2.2”项下质谱条件,精密吸取供试品溶液 $10 \mu\text{L}$ 注入液质分析仪进行测定,记录被测成分的峰面积,计算被测成分含量的相对标准偏差(RSD)值,结果 RSD 值均小于 3.68%,说明重复性良好。

取同一供试品溶液,连续进样 6 次,计算被测成分含量的 RSD 值,结果被测成分 RSD 值均小于 3.85%,说明仪器精密度良好,实验结果见表 3。

3.2.5 准确度 取同一批参松养心胶囊样品 0.1 g,精密称定,精密加入一定量的已知纯度的被

测成分对照品,按“2.3.1”项下供试品溶液的制备方法,分别进行超声提取,过滤。按“2.2.1”项下色谱条件和“2.2.2”项下质谱条件,精密吸取供试品溶液 $10 \mu\text{L}$ 注入液质分析仪进行测定,记录被测成分峰面积,计算平均回收率及 RSD 值,评价准确度。结果发现,20 种待测化合物平均回收率在 96.38% ~ 103.09% 范围之内,RSD 值在 0.86% ~ 3.65%,表明实验所采用的方法准确度较好,相关数据见表 3。

3.2.6 稳定性 取同一供试品溶液,分别于 0、4、8、12、24 h 进行检测,考察各成分含量的相对标准偏差。结果表明,供试品溶液中的 20 种待测成分在 24 h 内稳定,RSD 值均小于 2.45%。

3.3 不同批次样品的含量测定

分别取 10 批参松养心胶囊样品 0.2 g,精密称

定,按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”和“2.2.2”项下检测条件进行检测,结果见表 4。

表 3 参松养心胶囊待测化合物精密度及准确度考察结果

Tab.3 Precision and accuracy of the method for the analytes in SSYX

Analyte	Precision/%		Accuracy				
	Repeatability	Intra-day	<i>m</i> (Original)	<i>m</i> (Spiked)	<i>m</i> (Found)	Recovery	RSD
	RSD	RSD	/μg	/μg	/μg	/%	/%
Berberastine	1.78	1.35	3.11	3.25	6.31	98.30	3.65
Berberine	3.68	2.56	134.06	136.20	269.16	99.19	2.05
Epiberberine	2.42	1.98	32.79	35.64	68.50	100.20	1.91
Loganin	1.56	2.12	74.59	75.38	147.79	97.10	1.36
Morrnonside	1.48	1.09	58.13	58.64	116.71	99.89	2.72
Paeoniflorin	0.97	1.34	198.89	200.28	398.52	100.17	2.24
Spinosin	0.99	1.57	24.29	25.52	49.16	97.44	1.31
Quercetin	1.56	2.24	3.06	3.12	6.25	102.26	1.48
Salvianolic acid A	2.42	2.01	154.74	160.45	311.55	97.73	1.70
Salvianolic acid B	2.16	3.85	316.25	320.36	625.02	96.38	0.86
Ginsenoside Rb1	1.98	1.27	61.52	62.78	126.24	103.09	1.40
Ginsenoside Rd	2.05	1.78	15.10	15.22	30.39	100.46	2.94
Ginsenoside Re	1.74	2.33	29.90	30.82	60.85	100.43	2.40
Ginsenoside Rf	1.93	2.01	12.82	13.32	25.90	98.21	2.44
Ginsenoside Rg1	1.85	2.22	29.65	30.12	59.67	99.66	1.88
Ginsenoside Rg2	2.86	1.97	3.37	3.58	6.88	97.86	2.25
Notoginsenoside R1	1.99	2.07	4.27	4.42	8.75	101.49	2.01
Deoxyschizandrin	3.45	2.16	38.90	40.26	78.94	99.45	1.98
Schisandrol A	2.11	1.58	0.372	0.42	0.796	100.94	2.36
Schisantherin A	1.98	1.04	26.94	28.36	55.64	101.21	2.45

表 4 10 批参松养心胶囊样品中 20 种待测物的含量. μg · g⁻¹

Tab.4 Contents of 20 constituents in 10 batches of SSYX samples. μg · g⁻¹

Compound	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
Berberastine	30.8	50.4	45.5	38.7	53.2	45.5	40.5	37.5	36.5	43.4
Berberine	1 324	1 049	1 294	1 294	1 483	1 584	1 347	1 348	1 456	1 453
Epiberberine	323.9	205.6	366.7	330.4	405.3	364.5	302.5	345.8	304.5	345.6
Loganin	736.7	430.5	685.7	628.6	798.5	684.5	563.7	535.6	540.4	509.5
Morrnonside	574.2	403.7	759.7	439.4	450.6	420.5	587.4	439.5	295.6	345.6
Paeoniflorin	1 954	1 647	2 750	2 612	3 085	1 896	2 584	2 894	3 058	3 045
Spinosin	239.9	205.6	257.5	320.4	301.6	246.5	259.6	235.7	205.4	234.0
Quercetin	30.2	31.6	55.7	70.3	60.3	43.6	58.6	46.5	47.5	80.4
Salvianolic acid A	1 528	1 447	1 274	1 745	1 653	1 204	1 845	1 365	1 574	1 769
Salvianolic acid B	3 123	5 394	6 128	5 869	6 035	5 392	5 893	5 862	5 893	5 931
Ginsenoside Rb1	607.6	550.6	495.6	659.6	578.4	585.6	604.5	607.5	649.0	634.8
Ginsenoside Rd	149.2	120.4	119.3	120.4	87.8	83.3	119.4	78.3	104.5	103.6
Ginsenoside Re	295.3	234.6	293.4	234.6	203.6	264.5	249.5	252.4	301.4	245.6
Ginsenoside Rf	126.6	106.7	137.2	119.4	123.5	120.5	104.5	115.6	104.5	108.5
Ginsenoside Rg1	292.9	256.8	284.5	300.5	304.6	320.5	285.5	324.6	307.5	279.4
Ginsenoside Rg2	33.3	32.6	36.5	34.6	36.5	32.5	34.5	25.8	30.5	38.7
Notoginsenoside R1	42.1	40.6	40.5	40.6	46.8	54.5	46.7	46.2	45.6	42.8
Deoxyschizandrin	384.2	454.5	394.5	587.5	403.7	554.6	375.4	373.5	347.6	479.6
Schisandrol A	3.67	4.45	4.44	6.87	4.76	5.76	5.60	5.86	6.32	7.68
Schisantherin A	266.1	368.8	239.5	497.6	205.6	430.5	376.5	284.5	430.4	403.3
Total	12 066	13 034	15 662	15 949	16 321	14 333	15 683	15 224	15 738	16 100

4 讨论

4.1 色谱条件的优化

为了提高待测物质的响应值,获得良好的峰形,同时缩短分析时间,分别考察了不同类型的色谱柱和流动相。对比了色谱柱 1 (Waters XBridge™ C₁₈ 柱,3.0 mm × 150 mm,3.5 μm) 和色谱柱 2 (Waters Symmetry C₁₈ 柱,4.6 mm × 250 mm,5 μm) 对化合物的分离效果,结果发现,色谱柱 1 对于生物碱有着极强的保留性,延长了其在色谱柱上保留时间,但却影响了槲皮素和三七皂苷 R1 的测定,而色谱柱 2 对各成分保留均可达到较好分离,因此选择色谱柱 2 为本实验用色谱柱。流动相中加入少量的电解质可以显著提高 ESI 的电离,从而提高分析物质的响应强度,因此试验了在流动相中加入不同浓度的乙酸铵 (0.2,0.5 和 1 mmol · L⁻¹) 和不同体积分数的甲酸 (0.01%,0.05% 和 0.1%),最终发现加入体积分数 0.1% 甲酸可以显著提高待测物的响应强度,并获得一个较好的峰型。

4.2 质谱方法和正负离子切换模式的建立

ESI 参数的优化对于 MS 信号的强弱有着至关重要的影响,为了优化各个化合物的质谱条件,分别将 20 种待测物以 10 μL · min⁻¹ 的速度,逐一注入 ESI 中,以便获得其母离子和最佳电离条件,从而建立多反应监测检测条件。结果表明,所有的待测物均能在正负离子模式下产生较好电离,但其响应值存在明显差异,正离子模式对于化合物 1~7 和化合物 18~20 具有更高的灵敏度;负离子模式对于化合物 8~17 具有更高的灵敏度。

当所研究的待测成分需要在不同的电离模式下进行检测时,通常有两种传统的方法可供选择,一种方法是同时应用正负离子模式进行检测,但此方法灵敏度较低,电离效率也不是很理想,另一种方法是使用单一的电离模式(正离子模式或负离子模式)进行检测,先后测定两针样品,但这种方法带来的时间和资源的浪费。本实验设计了分段检测的模式,使 ESI 的离子源在合适的时间点在正负离子间进行切换:在 0.00~10.21 min 内,应用正离子模式测定化合物 1~7;随后使用 0.03 min 切换成负离子模式,在 10.24~14.24 min 内,应用负离子模式测定化合物 8~17;再使用 0.03 min 切换回正离子模式,在 14.27~21.00 min 内,应用正离子模式完成化合物 18~20 的检测。通过使用正负离子切换的方法,在较短时间内,获得了待测物的最佳电离效果,完成了检测。

通常情况下,正离子模式下的 [M]⁺、[M+H]⁺、[M+NH]⁺ 和负离子模式下的 [M-H]⁻ 被认为是稳定且丰度较大的分子离子,因此我们选定 [M]⁺ 作为化合物 1~3, [M+NH]⁺ 作为化合物 4~6, [M+H]⁺ 作为化合物 7 和 18~20, [M-H]⁻ 作为化合物 8~17 的母离子。同时对解簇电压 (DP) 和碰撞能量 (CE) 进行了优化,获得了相对丰度较大的母离子和子离子。

待测物中含有 3 对同分异构体(小檗碱和表小檗碱、人参皂苷 Rd 和 Re、人参皂苷 Rf 和 Rg1),其在质谱测定过程中能产生相同的母离子和子离子,难以通过质谱进行分离,因此在本实验中通过调整流动相比比例,使其得到了良好的分离与测定。

4.3 样品分析

将该分析方法应用于 10 批参松养心胶囊的分析和质量评价之中,计算各批次样品中各成分的含量,结果 10 批样品中 20 种化合物含量的平均值约为 15 mg · g⁻¹,对其进行统计分析,计算各成分的最大值、上四分位数、中位数、下四分位数及最小值,绘制箱式图(图 5)。结果表明,丹酚酸 A、丹酚酸 B、芍药苷、小檗碱 4 种成分的整体含量明显高于其他成分,丹酚酸 A 和丹酚酸 B 来源于丹参药材,芍药苷来源于赤芍,二药合用共同在方中发挥了活血化瘀的作用;小檗碱可降低心肌梗死大鼠室性早搏的发生率,对室性心动过速明显抑制,减少心律失常发生^[15]。槲皮素、三七皂苷 R1、表小檗碱、人参皂苷 Rg2 和五味子醇甲为含量较少的活性成分,其中以五味子醇甲最少,仅为 5.54 μg · g⁻¹。文献^[16-18]报道,五味子醇甲具有较好的抗炎和抗氧化作用,显著增强小鼠网状内皮系统的吞噬功能,增加机体的免疫能力,减少乳酸脱氢酶的释放量,降低 DNA 的损伤;槲皮素是一种天然的螯合剂,可以清除自由基和超氧阴离子,发挥抗氧化作用;三七皂苷 R1 能够减少心肌缺血/再灌注损伤大鼠的心肌梗死面积缩小,减轻组织病理学损伤及心功能障碍,增强细胞活力,减少细胞凋亡。因此,这些低含量的成分可能在参松养心胶囊抑制心肌重构,发挥非离子通道作用方面发挥了重要的作用,体现了中药的“多因多效多靶点”的作用特点。

4.4 成分选择分析

参松养心胶囊组方共 12 味中药,前期研究鉴定的 99 种化学成分均来自于方中的 10 味植物药,其中龙骨和土鳖虫 2 味中药的化学成分未得到鉴定,因此本研究仅对来源于植物药部分的成分进行了质

量研究。研究中涉及的 20 种化合物,来源于 8 味药材,其中 7 种化合物(包括人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rf、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rg2、三七皂苷 R1)来源于人参药材,人参为方中君药,具有补益心气、生津养血的作用,因此重点考虑了人参中与药效相关的可测成分。五味子甲素、五味子醇甲和五味子酯甲 3 种木脂素类成分来源于南五味子药材,南五味子具有敛气生津,养阴复脉的功效,其木脂素类成分是其保肝抗炎抗氧化的主要活性成分^[19]。马钱苷和莫诺苷来源于山茱萸,斯皮诺素来源于酸枣仁,槲皮素来源于桑寄生,3 药合用,具有养心阴、益肝血及敛心气的功效,现代药

理研究表明,山茱萸中以马钱苷和莫诺苷为代表的环烯醚萜苷类成分是发挥肝肾保护作用的主要活性成分^[20],酸枣仁中斯皮诺素等黄酮类成分是其发挥镇静催眠、抗氧化作用的主要活性成分^[21],桑寄生中槲皮素等黄酮类成分在其抗炎抗氧化等药理作用中发挥着重要的作用^[22]。丹参酸 A 和丹参酸 B 来源于丹参,芍药苷来源于赤芍,二药具有活血祛瘀的功效,文献[23-24]报道丹参中的丹酚酸类成分和赤芍中以芍药苷为代表的单萜糖苷类成分主要通过抗氧化及抗炎活性在心脑血管疾病治疗中发挥作用。盐酸小檗碱、小檗红碱、表小檗碱 3 种成分来源于黄连药材,与酸枣仁共同发挥清心安神的功效。

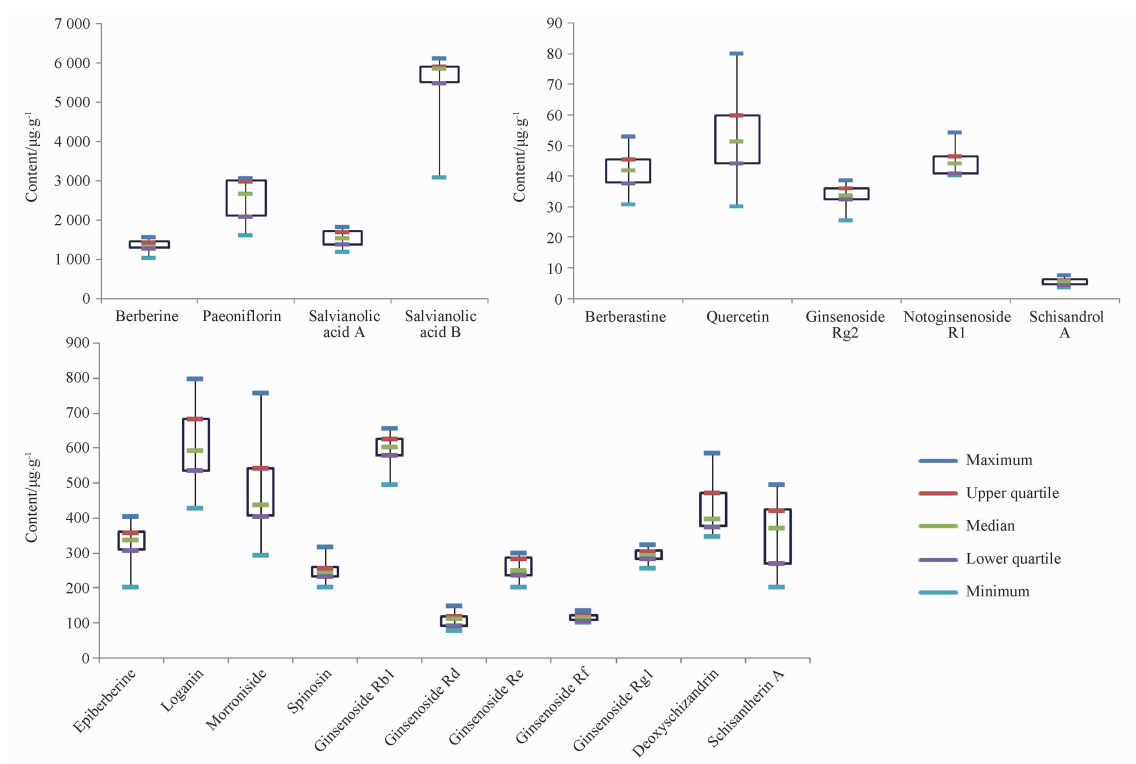


图 5 10 批参松养心胶囊样品中 20 种化合物箱式统计分析图

Fig. 5 The box plot of the contents of 20 constituents in 10 batches of SSYX samples

另外,人参皂苷 Rg2 有两种构型,分别为 20S-人参皂苷 Rg2 和 20R-人参皂苷 Rg2,本研究中进行化合物靶点预测时未进行区分;在进行定量检测时,由于其含量较低,亦未对二者进行分离,以 20S-人参皂苷 Rg2 为对照,采用了合并计算的方式,药品中二者各自的含量还有待进一步研究。

REFERENCES

[1] CHEN H X, GUO Q H, LIU L, *et al.* Study on Shensong Yangxin capsule preventing pituitrin induced acute myocardium

ischemia [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2007, 27(11):1520-1522.

[2] REN J Y, LI L J, WANG R J, *et al.* Effects of Shen-song-yangxin capsule on ventricular arrhythmias in ischemia/reperfusion experiment with rats [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 2008, 88(48):3440-3443.

[3] ZHANG J, FENG H B, LI J, *et al.* Protective effect of shensongyangxin capsule on cardiomyocytes in rats with myocardial infarction and Its possible mechanism [J]. *Prev Treat Cardio-Cerebral-Vascular Dis* (心脑血管病防治), 2017, 17(5):332-334.

[4] ZHOU G Z, OUYANG S, HOU Y M, *et al.* Electrophysiological effects of Shensong Yangxin capsule in rapid atrial pacing rabbit

- fibrillation [J]. *Chin J Geron* (中国老年学杂志), 2022, 42(17):4241-4244.
- [5] YANG H J, KONG B, SHUAI W, *et al.* Shensong Yangxin attenuates metabolic syndrome-induced atrial fibrillation via inhibition of ferroportin-mediated intracellular iron overload [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154086.
- [6] WANG A H, PU J L, QI X Y, *et al.* Evaluation of Shensong Yangxin capsules in the treatment of paroxysmal atrial fibrillation: a randomized, double-blind and controlled multicenter trial [J]. *Natl Med J China*(中华医学杂志), 2011, 91(24): 1677-1681.
- [7] WANG G B. Effect of Shensong Yangxin capsule on sinus bradycardia with premature ventricular beat [J]. *Chin Remed Clin* (中国药物与临床), 2021, 21(13):2343-2344.
- [8] REN X, YANG J, ZHANG K T, *et al.* Shensong Yangxin capsule therapy for atrial fibrillation: an overview of systematic reviews [J]. *Chin J Integra Med Card-Cerebro Dis* (中西医结合心脑血管病杂志), 2021, 19(22):3830-3834.
- [9] JIANG X G, JIA J M, LI Y S, *et al.* Simultaneous determination of eight bioactive constituents in Shensong Yangxin Capsule by UPLC [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(3):212-216.
- [10] LIU M Y, ZHAO S H, WANG Y F, *et al.* Simultaneous determination of eight active ingredients in Shensong Yangxin capsule by UPLC [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2014, 34(6):435-438.
- [11] CHEN L X, HAN Y, TIAN P Y, *et al.* Determination of four components in Shensong Yangxin capsule by HPLC [J]. *J Shenyang Pharma Univ* (沈阳药科大学学报), 2022, 39(4):430-434.
- [12] DONG Q H, LIU H, ZHOU B S, *et al.* Analysis of brain components and mechanism of Danshen ligustrazine injection based on UPLC-Q/TOF-MS and network pharmacology [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2020, 55(21):1795-1801.
- [13] SUN C H, TIAN Y, LI R M, *et al.* Potential pharmacological substance basis study of Lianxia Xiaopi Granules for the treatment of functional dyspepsia by UPLC-Q/TOF-MS integrated with network pharmacology [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2022, 57(1):44-51.
- [14] LIU M Y, ZHAO S H, WANG Y F, *et al.* Identification of multiple constituents in Chinese medicinal prescription Shensong Yangxin capsule by ultra-fast liquid chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chrom Sci*, 2015, 53:240-252.
- [15] YE L L, JIN H, HE Y H, *et al.* Research progress of berberine in the treatment of cardiovascular diseases [J]. *Clin J Tradit Chin Med* (中医药临床杂志), 2023, 35(1):174-178.
- [16] BAI Z L, SONG L, ZHENG Y W, *et al.* Research progress on pharmacology of schisandrin A [J]. *J Pract Trad Chin Inter Med* (实用中医内科学杂志), 2021, 35(2):18-20.
- [17] TAN L, TNAG Q K, WANG S Z, *et al.* Progress in pharmacological of Notoginsenoside R1 [J]. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2018, 34(5):604-607.
- [18] MA N, LI Y J, FAN J P, *et al.* Research progress on pharmacological action of quercetin [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med* (辽宁中医药大学学报), 2018, 20(8):221-224.
- [19] ZHANG X M, HUANG G Y, BAI Y Q, *et al.* Research advances in chemical constituents and hepatoprotective effect of schisandrae sphenantherae fructus and schisandrae chinensis fructus [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2021, 46(5):1017-1025.
- [20] CUI Y X, WANG L L, SUN X Y, *et al.* Research progress of cornel iridoid glycosides [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2021, 36(5):2869-2874.
- [21] HU J Y, DAI L X, ZHANG D S, *et al.* Research progress on pharmacological action of flavonoids in Ziziphi Spinosae Semen [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2021, 35(10):785-786.
- [22] LU X, LIN C Y, ZHANG W Q, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of trib. Ioranthae in China [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2022, 29(12): 1-19.
- [23] MA X J, YANG J, MA G R, *et al.* Modernization of Chinese medicine salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma: a review [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2022, 47(19): 5131-5139.
- [24] WU L F, WANG Z M, HE K Q, *et al.* Chemical constituents and pharmacological effects of paeoniae radix rubra: a review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2021, 27(18):198-206.

(收稿日期:2022-12-17)