

基于定性、定量及化学模式识别分析的蒙药森登-4质量评价[△]

周枫叶^{1*},李君^{2,3},张谦^{2,3},李荣杰¹,张微^{2,3},刘静^{2,3},王芳^{2,3},李胜男^{4#}(1.内蒙古医科大学附属医院药学部,呼和浩特 010030;2.内蒙古医科大学药学院,呼和浩特 010110;3.内蒙古自治区新药筛选工程研究中心,呼和浩特 010110;4.内蒙古医科大学附属医院内分泌科,呼和浩特 010030)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)09-1040-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.09.04



摘要 目的 基于定性、定量及化学模式识别分析对蒙药森登-4进行质量评价,以期为其质量控制提供参考。**方法** 采用高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(HPLC-Q-Exactive-MS)技术对森登-4中化学成分进行定性分析;采用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)技术定量分析15批森登-4样品(S1~S15)中16个成分(没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、表儿茶素、二氢杨梅素、京尼平-1-O-β-D-龙胆双糖苷、咖啡酸、儿茶素、柯里拉京、去乙酰车叶草苷酸甲酯、芦丁、栀子苷、木犀草素、杨梅素、槲皮素、阿魏酸、川楝素)的含量;对15批样品进行聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘-判别分析,并以变量重要性投影(VIP)值大于1为标准筛选差异性成分。**结果** 在森登-4中共鉴定出73个化学成分,包括20个黄酮类、16个鞣质类、14个有机酸类成分等。定量分析结果显示,上述16个成分的含量分别为3.683~7.730、2.391~6.952、2 275.538~4 377.491、2 699.188~3 537.924、858.266~1 377.393、3.366~11.003、140.624~315.683、414.629~978.334、285.501~1 510.457、27.799~48.325、3 625.415~6 309.563、0.506~0.656、442.337~649.283、47.093~59.736、12.942~15.822、127.738~326.649 μg/g。聚类分析和主成分分析结果显示,15批森登-4样品可聚为2类:S1~S3、S5~S6、S9~S10、S13样品聚为一类,S4、S7~S8、S11~S12、S14~S15样品聚为另一类;表儿茶素、京尼平-1-O-β-D-龙胆双糖苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、栀子苷的VIP值大于1。**结论** 本研究采用HPLC-Q-Exactive-MS和HPLC-MS/MS技术对森登-4进行了定性、定量分析,并结合化学模式识别分析筛选出了栀子苷、表儿茶素、去乙酰车叶草苷酸甲酯、京尼平-1-O-β-D-龙胆双糖苷4个差异性成分。

关键词 森登-4;定性分析;定量分析;化学模式识别分析;含量测定;质量评价;差异性成分

Quality evaluation of Mongolian medicine Sendeng-4 based on qualitative and quantitative analysis combined with chemical pattern recognition

ZHOU Fengye¹, LI Jun^{2,3}, ZHANG Qian^{2,3}, LI Rongjie¹, ZHANG Wei^{2,3}, LIU Jing^{2,3}, WANG Fang^{2,3}, LI Shengnan⁴
(1. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China;
2. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 3. Inner Mongolia Autonomous Region Engineering Research Center of New Pharmaceutical Screening, Hohhot 010110, China;
4. Dept. of Endocrinology, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To evaluate the quality of Mongolian medicine Sendeng-4 based on qualitative and quantitative analysis combined with chemical pattern recognition, in order to provide the reference for its quality control. **METHODS** The chemical components in Sendeng-4 were analyzed qualitatively by HPLC-Q-Exactive-MS. The contents of 16 components (methyl gallate, ethyl gallate, epicatechin, dihydromyricetin, genipin-1-O-β-D-gentibioside, caffeic acid, catechin, corilagin, deacetylasperulosidic acid methyl ester, rutin, geniposide, luteolin, myricetin, quercetin, ferulic acid, and toosendanin) in 15 batches of Sendeng-4 (sample S1-S15) were quantitatively analyzed by HPLC-MS/MS. Cluster analysis (CA), principal component discriminant analysis (PCA), and orthogonal partial least squares projection (VIP) value greater than 1 was used as the index to screen the differential components. **RESULTS** A total of 73 chemical components were identified in Sendeng-4, including 20 flavonoids, 16 tannins, 14 organic acids, etc. According to the quantitative analysis, the results exhibited that the average contents of above 16 components in 15 batches of Sendeng-4 were 3.683-7.730, 2.391-6.952, 2 275.538-4 377.491, 2 699.188-3 537.924, 858.266-1 377.393, 3.366-11.003, 140.624-315.683, 414.629-978.334, 285.501-1 510.457, 27.799-48.325, 3 625.415-6 309.563, 0.506-0.656, 442.337-649.283, 47.093-59.736,

△基金项目 国家自然科学基金项目(No. 82460822, No. 82360801);内蒙古自治区自然科学基金项目(No.2024QN08054, No. 2023QN08012);内蒙古自治区卫生健康科技计划项目(No. 202201187);内蒙古医科大学联合项目(No. YKD2024LH005, No. YKD2023LH062, No. YKD2022LH031);内蒙古医学科学院公立医院科研联合基金科技项目(No.2024GLLH0329)

*第一作者 主管药师,硕士。研究方向:中蒙药药效物质及临床药学。E-mail:450650820@qq.com

#通信作者 副主任护师。研究方向:中蒙药改善糖尿病皮肤溃疡研究。E-mail:hhlsn2008@163.com

12.942-15.822, 127.738-326.649 $\mu\text{g/g}$, respectively. According to the results of CA and PCA, 15 batches of samples could be clustered into two categories: S1-S3, S5-S6, S9-S10 and S13 were clustered into one category; S4, S7-S8, S11-S12, S14-S15 were clustered into one category. VIP values of geniposide, epicatechin, deacetylasperulosidic acid methyl ester and genipin-1-O- β -D-gentiobioside were all greater than 1. **CONCLUSIONS** HPLC-Q-Exactive-MS and HPLC-MS/MS techniques are employed for the qualitative and quantitative analysis of Sendeng-4. Through chemical pattern recognition analysis, four differential components are identified: geniposide, epicatechin, deacetylasperulosidic acid methyl ester, and genipin-1-O- β -D-gentiobioside.

KEYWORDS Sendeng-4; qualitative analysis; quantitative analysis; chemical pattern recognition analysis; content determination; quality evaluation; differential components

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种慢性炎症性和自身免疫性疾病。全球疾病负担组织调查显示,2050年该病患病人数将达3 170万^[1-2],这将对全球医疗卫生系统带来巨大的冲击。蒙药森登-4收载于《中华人民共和国卫生部药品标准(蒙药分册)》^[3],由文冠木、梔子、诃子、川楝子4味药材组成,在临床常用于治疗RA等疾病^[4]。方中文冠木为主药,可消肿、止痛;梔子、川楝子为佐药,可清热利湿、行气止痛;诃子为辅药,可解毒;四药合用,共奏消肿、止痛的功效。

近年来,有关森登-4的研究多侧重于药效学评价、作用机制研究等方面^[5-6],质量标准研究相对较少,而科学合理的质量评价体系是传统制剂高质量发展的重要前提。森登-4现行质量标准仅对其制法、功能主治及用法用量进行了规范,尚缺乏含量测定项,这制约了该制剂的现代化发展。为此,本课题组前期采用指纹图谱技术和化学模式识别分析从森登-4中筛选出了10个潜在质量差异标志物,并通过对照品明确了柯里拉京、鞣花酸、诃子酸及二氢杨梅素4个成分^[7],但若仅将这4个成分用于森登-4的质量评价尚存在一定的局限性。

高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(HPLC-Q-Exactive-MS)技术兼具高效的分离特性和质谱的结构表征能力;高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)技术在定量分析时,各成分可同时在独立通道进行分析,在多指标定量分析过程中具有分析周期短、灵敏度高等优势。基于此,本研究拟采用HPLC-Q-Exactive-MS技术对森登-4的化学成分进行快速、精准解析,在明确其物质组成的基础上,结合2020年版《中国药典》(一部)记载的森登-4处方中单味药材的质控指标^[8],并结合现有文献报道^[9-11],选取梔子中梔子苷、京尼平-1-O- β -D-龙胆双糖苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、木犀草素,诃子中没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、柯里拉京,文冠木中槲皮素、杨梅素、二氢杨梅素、表儿茶素、儿茶素、芦丁,川楝子中川楝素、咖啡酸、阿魏酸作为定量指标,运用HPLC-MS/MS技术对这16个成分进行定量分析;同时,依靠化学模式识别分析方法多层次、多视角地筛选影响森登-4质量的差异性成分,以期为今后森登-4的质量控制提供数据支撑。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有8045型三重四极杆液质

联用仪(日本Shimadzu公司)、HPLC-Q-E型高效液相色谱-质谱联用仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)、BSA224S型万分之一天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]、TGL-16MC型高速冷冻离心机(长沙湘锐离心机有限公司)、FA1204B型十万分之一电子天平(青岛聚创世纪环保科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

阿魏酸(批号110773-201915,纯度≥99.4%)、芦丁(批号100080-202012,纯度≥98.0%)的对照品均购自中国食品药品检定研究院;木犀草素对照品(批号DSTDMD003201,纯度≥98.0%)购自成都德思特生物技术有限公司;二氢杨梅素、儿茶素、京尼平-1-O- β -D-龙胆双糖苷、柯里拉京、梔子苷、杨梅素、川楝素、槲皮素、没食子酸乙酯、没食子酸甲酯、咖啡酸、去乙酰车叶草苷酸甲酯、表儿茶素(批号分别为PU0275、PU0722、PS2327、PU0414、PU0290、PS1149、PU1056、PU0698、PS2066、PS2287、PU1191、PS2471、PU0055,纯度均不低于98.0%)均购自成都普思生物技术有限公司。

文冠木(共3批,产地为湖北、内蒙古,批号分别为052950101、C20112813、C20071906)、梔子(共3批,产地为福建、江西,批号分别为230501054、20190727、23022105)、诃子(共3批,产地为广西、广东、云南,批号分别为220325、211108、200911)、川楝子(共3批,产地为四川,批号分别为20101810、210602CP613、20210624)饮片均购自内蒙古北域药业有限责任公司,经内蒙古医科大学药学院生药教研室渠弼教授鉴定均为真品。将上述12批饮片采用随机数表法并按处方比例进行随机组合,获得15批(编号S1~S15)森登-4样品。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 森登-4供试品溶液

取森登-4样品适量,粉碎,过四号筛,取约1 g至50 mL锥形瓶中,加90%甲醇10 mL,称质量;超声(功率200 W,频率70 kHz)提取40 min,冷却至室温,再次称质量,用90%甲醇补足减失的质量;摇匀,以0.22 μm 滤膜过滤,即得定性用供试品溶液。取定性用供试品溶液适量,用90%甲醇稀释100倍,再以0.22 μm 滤膜过滤后,即得定量用供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液

精密称取没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、表儿茶素、

二氢杨梅素、京尼平-1-O- β -D-龙胆双糖苷、咖啡酸、儿茶素、柯里拉京、去乙酰车叶草苷酸甲酯、芦丁、栀子苷、木犀草素、杨梅素、槲皮素、阿魏酸、川楝素对照品适量, 分别置于10 mL容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 即得各成分质量浓度分别为469.00、770.00、431.00、382.00、461.00、464.00、258.00、489.00、431.00、160.00、379.00、233.00、319.00、86.00、688.00、404.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单一对照品储备液。

精密吸取上述单一对照品储备液各10 μL 于同一10 mL容量瓶中, 加入90%甲醇定容, 即得上述成分质量浓度分别为469.00、770.00、431.00、382.00、461.00、464.00、258.00、489.00、431.00、160.00、379.00、233.00、319.00、86.00、688.00、404.00 ng/mL的定性用混合对照品溶液。

另精密移取上述单一对照品储备液各适量于同一10 mL容量瓶中, 加入90%甲醇定容, 即得上述成分质量浓度分别为46.90、77.00、8 620.00、7 640.00、9 220.00、92.80、2 580.00、4 890.00、8 620.00、160.00、7 580.00、23.30、3 190.00、860.00、688.00、808.00 ng/mL的定量用混合对照品溶液。

2.2 森登-4的定性分析

2.2.1 色谱、质谱条件

采用Agilent Eclipse Plus C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇(A)-0.1%甲酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~6 min, 7%A; 6~11 min, 7%A→21%A; 11~14 min, 21%A→43%A; 14~17 min, 43%A→60%A; 17~20 min, 60%A→75%A; 20~24 min, 75%A→80%A; 24~28 min, 80%A→85%A; 28~35 min, 85%A→93%A; 35~40 min, 93%A);柱温为35 °C;流速为0.35 mL/min;进样量为10 μL 。离子源为加热电喷雾离子源, 以Full MS/dd-MS²模式检测, Full MS、dd-MS²模式的分辨率分别为70 000、17 500;喷雾电压为3.50 kV(−)/4.20 kV(+)碰撞能量为30 eV。

2.2.2 森登-4的化学成分辨识分析

以中国知网、万方数据等数据库中的相关文献数据为基础, 建立森登-4的本地数据库(包含化合物名称、分子式、离子模式及质谱碎片);同时, 按“2.2.1”项下色谱、质谱条件对森登-4定性用供试品溶液(编号S1)和定性用混合对照品溶液进行分析, 获得森登-4定性用供试品溶液在正、负离子模式下的总离子流图, 详见图1(森登-4定性用混合对照品溶液的总离子流图略), 利用质谱软件对总离子流数据进行处理、分析(处理过程包括分子式的拟合、峰提取、精确分子量及偏差计算)。以质量偏差不超过 10×10^{-6} ppm为标准, 结合本地数据库信息, 对森登-4中化学成分进行解析。结果显示, 在森登-4样品中共鉴定出73个化学成分, 包括20个黄酮类、16个鞣质类、14个有机酸类、11个环烯醚萜类、4个三萜类、4个脂肪酸类和4个氨基酸类成分(具体鉴定结果, 请扫描本文首页的二维码进入“增强出版”页面查看附表1)。

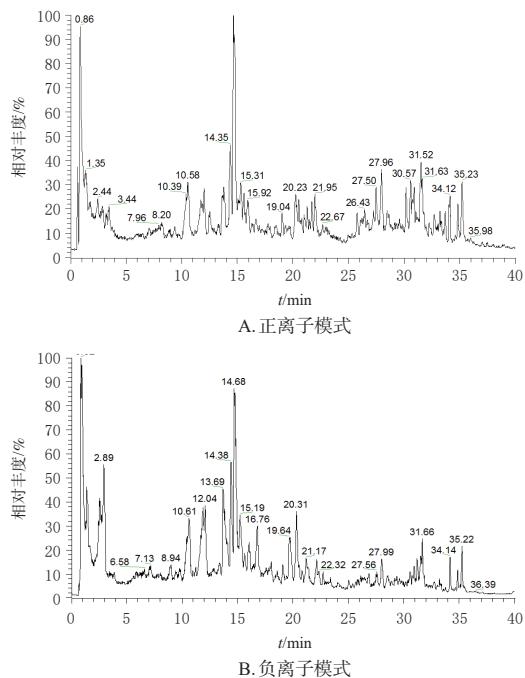


图1 森登-4定性用供试品溶液的总离子流图

2.3 森登-4的定量分析

2.3.1 色谱、质谱条件

采用Shim-pack GIST-HP C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3 μm), 以甲醇(A)-0.1%甲酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0.01~0.40 min, 10%A→24%A; 0.40~2.00 min, 24%A→42%A; 2.00~3.05 min, 42%A→55%A; 3.05~4.10 min, 55%A→68%A; 4.10~5.05 min, 68%A→90%A; 5.05~6.00 min, 90%A→95%A; 6.00~7.00 min, 95%A; 7.00~7.51 min, 95%A→10%A; 7.51~9.50 min, 10%A);流速为0.25 mL/min;柱温为35 °C;进样量为5 μL 。离子源为电喷雾离子源, 采用多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)方式在负离子模式下扫描;加热气流量为10 L/min;脱溶剂温度为526 °C;雾化气流量为3 L/min。

2.3.2 专属性考察

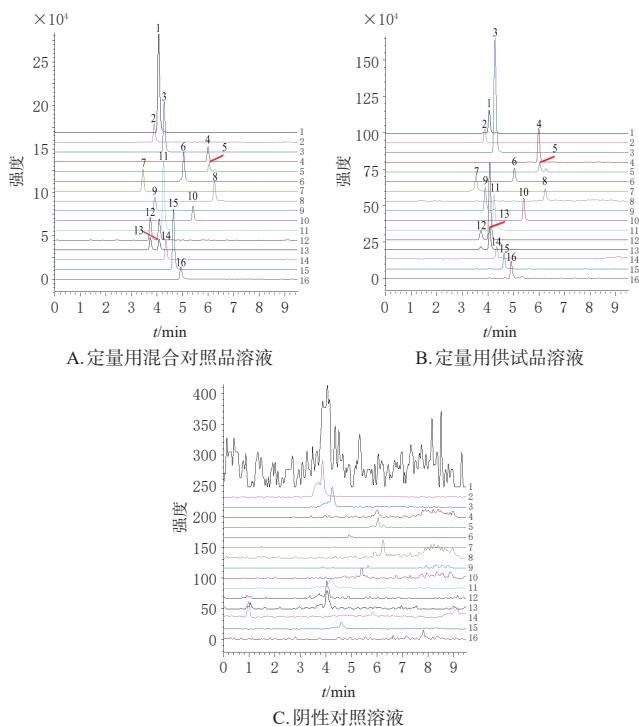
16个待测成分经前体离子扫描、产物离子扫描、电压优化及色谱洗脱程序处理后, 分别获得其MRM分析参数(表1)。取“2.1.1”项下森登-4定量用供试品溶液(编号S1)、“2.1.2”项下定量用混合对照品溶液及阴性对照溶液(90%甲醇), 分别按“2.3.1”项下条件进样分析, 记录各样品的MRM色谱图(图2)。结果显示, 森登-4定量用供试品溶液谱图中待测成分的保留时间与定量用混合对照品溶液中对应成分一致, 且阴性对照溶液在相应位置无干扰。

2.3.3 线性关系考察

精密量取“2.1.2”项下定量用混合对照品溶液0.01、0.02、0.10、0.20、0.40、0.80、1.00 mL, 分别置于1.0 mL容量瓶中, 用90%甲醇定容, 即得系列混合对照品溶液;取上述系列混合对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱、质谱条件进样分析, 以各成分质量浓度($X, \text{ng}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性关系拟合, 结果见表2。

表1 16个成分的MRM分析参数

成分	保留时间/min	m/z	碰撞能量/eV
没食子酸甲酯	4.070	183.2→124.0(—)	22
没食子酸乙酯	4.639	197.3→124.0(—)	22
表儿茶素	4.084	289.3→109.0(—)	25
二氢杨梅素	4.250	319.3→192.9(—)	12
京尼平-1-O-β-D-龙胆双糖苷	3.921	549.3→225.1(—)	15
咖啡酸	4.341	179.3→135.0(—)	16
儿茶素	3.737	289.3→109.1(—)	25
柯里拉京	3.886	632.9→300.9(—)	45
去乙酰车叶草苷酸甲酯	3.460	403.0→240.9(—)	12
芦丁	5.037	609.3→301.0(—)	36
栀子苷	4.313	433.0→225.1(—)	14
木犀草素	6.240	285.3→133.0(—)	35
杨梅素	5.406	317.3→179.0(—)	20
槲皮素	6.003	301.3→151.0(—)	23
阿魏酸	4.956	193.3→134.0(—)	16
川楝素	6.039	573.2→531.1(—)	20



1:没食子酸甲酯;2:柯里拉京;3:栀子苷;4:槲皮素;5:川楝素;6:芦丁;7:去乙酰车叶草苷酸甲酯;8:木犀草素;9:京尼平-1-O-β-D-龙胆双糖苷;10:杨梅素;11:二氢杨梅素;12:儿茶素;13:表儿茶素;14:咖啡酸;15:没食子酸乙酯;16:阿魏酸。

图2 各样品的MRM色谱图

2.3.4 精密度考察

取“2.3.3”项下稀释10倍后的混合对照品溶液,按“2.3.1”项下色谱、质谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果显示,各成分峰面积的RSD为0.64%~2.74%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性考察

称取森登-4样品(编号S1)约1.0 g,按“2.1.1”项下方法制备定量用供试品溶液,分别在室温下放置0、2、4、8、12、18、24 h时,按“2.3.1”项下色谱、质谱条件进样分析,记录峰面积。结果显示,各成分峰面积的RSD为

表2 16个成分的回归方程与线性范围

成分	线性方程	r	线性范围/(ng/mL)
没食子酸甲酯	$Y=2.90 \times 10^3 X + 9.33 \times 10^2$	0.9995	0.469~46.900
没食子酸乙酯	$Y=1.83 \times 10^3 X + 1.16 \times 10^4$	0.9991	0.770~77.000
表儿茶素	$Y=4.35 \times 10^3 X + 5.75 \times 10^4$	0.9992	86.200~8620.000
二氢杨梅素	$Y=5.12 \times 10^3 X + 4.72 \times 10^4$	0.9996	76.400~7640.000
京尼平-1-O-β-D-龙胆双糖苷	$Y=89.70 X + 1.49 \times 10^4$	0.9992	92.200~9220.000
咖啡酸	$Y=6.18 \times 10^3 X - 3.13 \times 10^3$	0.9990	0.928~92.800
儿茶素	$Y=7.90 \times 10^3 X + 2.57 \times 10^4$	0.9991	25.800~2580.000
柯里拉京	$Y=1.36 \times 10^3 X + 5.04 \times 10^3$	0.9993	48.900~4890.000
去乙酰车叶草苷酸甲酯	$Y=12.10 X + 2.13 \times 10^3$	0.9994	86.200~8620.000
芦丁	$Y=1.91 \times 10^3 X - 1.32 \times 10^3$	0.9992	1.600~160.000
栀子苷	$Y=1.96 \times 10^3 X + 5.49 \times 10^4$	0.9990	75.800~7580.000
木犀草素	$Y=1.42 \times 10^3 X - 2.67 \times 10^3$	0.9998	0.233~23.300
杨梅素	$Y=1.95 \times 10^3 X - 4.91 \times 10^4$	0.9997	31.900~3190.000
槲皮素	$Y=5.26 \times 10^3 X + 2.53 \times 10^4$	0.9995	8.600~860.000
阿魏酸	$Y=9.42 \times 10^3 X - 5.80 \times 10^3$	0.9990	6.880~688.000
川楝素	$Y=4.83 \times 10^3 X + 4.36 \times 10^4$	0.9994	8.080~808.000

1.08%~2.69%(n=7),表明该定量用供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.6 重复性考察

称取森登-4样品(编号S1)约1.0 g,平行称取6份,按“2.1.1”项下方法制备定量用供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱、质谱条件进样分析,并根据线性回归方程计算各成分含量。结果显示,没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、表儿茶素、二氢杨梅素、京尼平-1-O-β-D-龙胆双糖苷、咖啡酸、儿茶素、柯里拉京、去乙酰车叶草苷酸甲酯、芦丁、栀子苷、木犀草素、杨梅素、槲皮素、阿魏酸、川楝素的含量依次为3.708、2.463、2.273.121、2.874.388、868.453、8.029、138.317、415.186、513.594、27.403、4.420.520、0.585、441.945、46.288、13.379、131.385 μg/g, RSD为1.02%~2.88%(n=6),表明该方法重复性良好。

2.3.7 加样回收率考察

称取已知各成分含量的森登-4样品(编号S1)约0.5 g,共6份,根据样品中各成分含量按近似1:1的质量比加入1 mL混合对照品溶液(精密移取“2.1.2”项下没食子酸甲酯、槲皮素、川楝素、芦丁、木犀草素、京尼平-1-O-β-D-龙胆双糖苷、儿茶素、咖啡酸、没食子酸乙酯、阿魏酸的单一对照品储备液适量置于同一10 mL容量瓶中,另精密称取去乙酰车叶草苷酸甲酯对照品2.49 mg、杨梅素对照品2.17 mg、二氢杨梅素对照品14.18 mg、柯里拉京对照品2.11 mg、栀子苷对照品21.36 mg、表儿茶素对照品11.64 mg置于上述同一容量瓶中,用甲醇定容,即得),按“2.1.1”项下方法制备定量用供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱、质谱条件进样分析,记录峰面积,并计算加样回收率。结果显示,各成分的加样回收率为96.77%~103.98%(n=6),表明该方法准确度良好。

2.3.8 森登-4中16个成分的含量测定

取15批森登-4样品,每批称样3份,按“2.1.1”项下方法制备定量用供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱、质谱条件进样分析,记录峰面积,并根据线性回归方程计算各成分含量,取平均值。结果见表3。

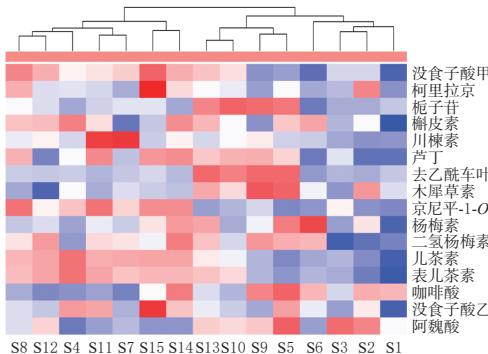
表3 15批森登-4样品中16个成分的含量测定结果($n=3$, $\mu\text{g/g}$)

成分	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
没食子酸甲酯	3.683	5.422	5.366	5.847	4.703	3.963	6.219	7.192	4.453	6.074	5.960	6.646	6.391	6.668	7.730
没食子酸乙酯	2.391	4.558	3.337	5.483	5.390	4.237	3.615	4.111	3.462	3.902	5.330	3.868	4.219	4.998	6.952
表儿茶素	2.275.538	2.700.621	3.034.890	4.377.491	2.871.595	3.122.538	3.822.748	3.846.951	3.123.213	3.695.990	4.006.914	4.034.969	3.803.755	3.889.293	3.894.272
二氢杨梅素	2.872.682	2.812.141	2.699.188	2.947.323	3.383.626	3.356.743	3.242.516	3.247.615	3.455.412	3.112.570	3.270.175	3.434.611	3.320.630	3.537.924	3.174.921
京尼平-1-O-β-D-龙胆双糖苷	866.182	886.845	1112.966	1192.951	858.266	897.979	1161.689	1377.393	1028.818	974.326	1373.232	1104.623	919.034	1311.138	1314.411
咖啡酸	8.246	8.624	5.902	3.905	11.003	8.327	3.366	4.668	9.954	4.978	4.424	3.540	5.963	10.218	6.677
儿茶素	140.624	178.412	203.997	315.683	177.599	197.242	279.597	270.936	206.720	232.826	277.576	284.810	247.297	282.874	283.050
柯里拉京	414.629	755.952	486.932	542.064	569.054	459.746	460.371	681.494	440.560	556.926	531.479	534.838	568.811	617.645	978.334
去乙酰车叶草苷酸甲酯	511.059	396.176	432.108	535.468	1498.808	285.501	517.284	537.001	1510.457	1354.284	434.006	509.589	1504.237	481.443	603.567
芦丁	27.799	27.818	37.561	38.776	41.761	28.907	34.846	44.271	44.580	44.388	48.325	29.655	42.635	47.814	46.944
栀子苷	4419.818	4140.053	4173.499	4080.598	6092.281	3625.415	4629.932	4796.927	6245.568	6309.563	4508.243	4606.109	5930.950	4078.060	4650.801
木犀草素	0.567	0.620	0.534	0.577	0.650	0.574	0.567	0.544	0.656	0.591	0.546	0.506	0.611	0.554	0.560
杨梅素	442.337	547.057	485.784	489.350	609.753	649.283	512.994	510.524	531.377	495.148	527.478	522.302	581.578	588.405	547.170
槲皮素	47.093	54.928	52.754	59.736	56.774	58.130	49.773	56.926	51.067	54.924	55.808	57.011	57.306	58.985	53.370
阿魏酸	14.163	15.397	15.691	12.942	15.822	13.361	13.678	13.965	14.651	14.471	13.375	14.538	14.579	13.268	13.273
川楝素	132.196	127.738	143.598	174.503	171.139	166.955	326.649	181.768	199.648	189.476	321.716	197.394	173.801	195.702	168.497

2.4 森登-4的化学模式识别分析

2.4.1 聚类分析

将森登-4样品中16个成分的平均含量导入微生信分析平台,采用完全连接法以平方欧氏距离进行聚类分析(cluster analysis, CA)^[12]。结果(图3)显示,15批森登-4样品被聚为2大类:S1~S3、S5~S6、S9~S10、S13样品聚为一类,S4、S7~S8、S11~S12、S14~S15样品聚为另一类。该结果提示,不同批次森登-4样品间存在一定质量差异。



注:颜色由红至蓝表示各成分相对含量逐渐降低。

图3 15批森登-4样品的CA结果

2.4.2 主成分分析和正交偏最小二乘-判别分析

将森登-4样品中16个成分的平均含量导入SIMCA 14.1软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。PCA结果(图4)显示,S1~S3、S5~S6、S9~S10、S13样品与其他批次样品明显分离,且上述样品间也具有一定离散趋势。OPLS-DA模型累计解释能力参数 R^2X 为0.817、 R^2Y 为0.906,预测能力参数 Q^2 为0.873,各参数均大于0.5,表明OPLS-DA模型建立成功;经200次置换检验发现,所有 Q^2 均在 R^2 之下,且 Q^2 的回归直线与y轴的交点在负半轴,进一步确证了该模型的有效性。基于上述模型获得各样品的OPLS-DA得分图(图5),结果与PCA结果相

似,且S1~S3、S5~S6、S9~S10、S13样品间离散趋势更为明显。以变量重要性投影(variable importance projection, VIP)值大于1为标准筛选影响森登-4样品质量的差异性成分^[13],结果(图6)显示,VIP值大于1的成分分别为栀子苷(VIP值为2.379)、表儿茶素(VIP值为2.178)、去乙酰车叶草苷酸甲酯(VIP值为1.711)、京尼平-1-O-β-D-龙胆双糖苷(VIP值为1.055)。

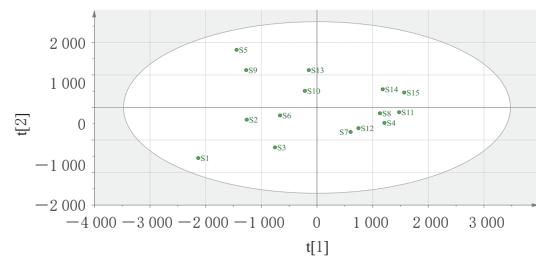


图4 15批森登-4样品的PCA得分图

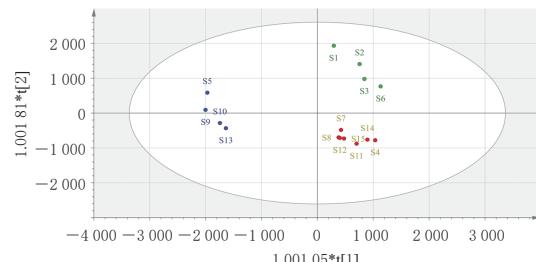


图5 15批森登-4样品的OPLS-DA得分图

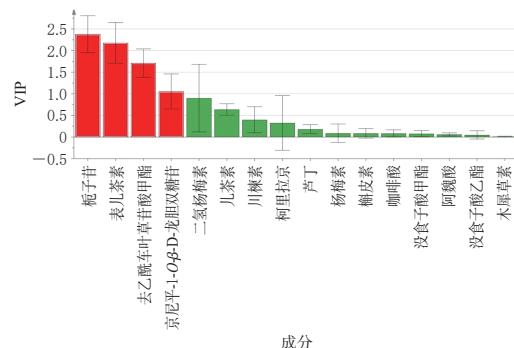


图6 森登-4样品中16个成分的VIP值

3 讨论

为获得准确、可靠的定性分析结果,本研究前期对不同提取溶剂及不同流动相组成进行了考察,结果发现,以90%甲醇作为提取溶剂、甲醇-0.1%甲酸溶液作为流动相时,能够获得更为丰富的质谱信息;另外,由于各成分理化性质存在差异,因此,本研究在供试品溶液分析过程采用了正、负离子2种扫描模式,最后在森登-4样品中共鉴定出了73个化学成分,主要包括黄酮类、鞣质类、有机酸类等成分。为保障定量分析结果的准确性和可靠性,笔者对各成分离子化模式进行了确认,结果发现,各成分均在负离子模式下具有较好的质谱响应;进一步经离子扫描获得定量离子对,并结合前体离子、产物离子及电压自动优化程序最终获得各成分的MRM分析参数。

采用本研究所建立的定量分析方法测得森登-4样品中栀子苷、京尼平-1-O- β -D-龙胆双糖苷、杨梅素、二氢杨梅素的含量分别为3 625.415~6 309.563、858.266~1 377.393、442.337~649.283、2 699.188~3 537.924 $\mu\text{g/g}$,测定结果与以往采用高效液相色谱技术测得的森登-4中栀子苷含量约为4 590.000 $\mu\text{g/g}$ 、京尼平-1-O- β -D-龙胆双糖苷含量约为940.000 $\mu\text{g/g}$ 、杨梅素含量约为548.000 $\mu\text{g/g}$ 、二氢杨梅素含量约为3 870.000 $\mu\text{g/g}$ ^[14-15]接近,进一步证实了本研究所建定量分析方法的准确性和可靠性。

由MRM定量分析结果可知,15批森登-4样品中16个指标成分含量均存在一定差异,而含量上的差异又是导致批次间质量差异的直接因素。为揭示哪些成分是引起不同批次森登-4样品质量差异的潜在质量标志物,本研究采用化学模式识别分析对复杂的含量测定结果进行了降维、识别、分类处理。由CA、PCA、OPLS-DA结果可知,S1~S3、S5~S6、S9~S10、S13样品与S4、S7~S8、S11~S12、S14~S15样品分离明显,且S1~S3、S5~S6、S9~S10、S13样品间也具有一定离散趋势。进一步分析发现,栀子苷、表儿茶素、去乙酰车叶草苷酸甲酯、京尼平-1-O- β -D-龙胆双糖苷可能是导致15批森登-4样品产生质量差异的潜在质量标志物;其中栀子苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯及京尼平-1-O- β -D-龙胆双糖苷主要来源于方中的栀子饮片,表儿茶素主要来源于方中的文冠木饮片。根据饮片随机组合信息发现,S5、S9~S10、S13样品中栀子饮片均来源于福建,且栀子苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯含量明显高于江西产栀子饮片;S4、S7~S8、S11~S12、S14~S15样品中文冠木饮片均来源于湖北,其所含表儿茶素含量高于内蒙古产文冠木饮片。故笔者推测不同产地的栀子、文冠木饮片可能是导致不同批次森登-4样品质量差异的关键因素。

综上所述,本研究采用HPLC-Q-Exactive-MS和HPLC-MS/MS技术对森登-4进行了定性、定量分析,并

结合化学模式识别分析获得了栀子苷、表儿茶素等4个差异性成分,该研究成果可为森登-4的质量控制提供数据支撑。

参考文献

- [1] GBD 2021 Other Musculoskeletal Disorders Collaborators. Global, regional, and national burden of other musculoskeletal disorders, 1990-2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021[J]. Lancet Rheumatol, 2023, 5(11):e670-e682.
- [2] NOVERSA DE SOUSA R, TASCILAR K, CORTE G, et al. Metabolic and molecular imaging in inflammatory arthritis[J]. RMD Open, 2024, 10(1):e003880.
- [3] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准:蒙药分册[M]. 呼和浩特:内蒙古科学技术出版社, 1998:185.
- [4] 赵洪超, 王冰雨, 贾鑫, 等. 蒙药森登-4中总黄酮在正常大鼠和风湿性关节炎大鼠血清中的药代动力学比较研究[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2020, 51(2):191-195.
- [5] 金刚, 徐艳华, 郝俊生, 等. 森登-4汤治疗骨性关节炎的靶点筛选及验证[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(1):80-83, 119.
- [6] 刘晓琼, 李志茹, 胡宾, 等. 蒙药森登-4对CIA大鼠CTLA-4/B7-1介导免疫炎症的初步研究[J]. 内蒙古医科大学学报, 2021, 43(5):476-480, 484.
- [7] 李君, 周枫叶, 张曼玲, 等. 基于指纹图谱和化学模式识别分析的蒙药森登-4质量评价研究[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(21):2447-2453, 2491.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社, 2020:44, 259.
- [9] 张雨, 范蒙蒙, 朱建光, 等. 川楝子化学成分、药理及毒理研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(12):218-226.
- [10] 刘宏, 王焕芸, 马岚, 等. HPLC波长转换法同时测定蒙药文冠木中5种成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(24):2996-2999.
- [11] 布仁满达, 吴杰斯, 敖敦格日乐, 等. UHPLC-MS/MS法测定不同周期蒙药文冠木枝和叶中8个成分的对比研究[J]. 药物分析杂志, 2024, 44(9):1497-1503.
- [12] 李君, 李荣杰, 周枫叶, 等. 蒙药三子散质量评价研究:指纹图谱、化学模式识别和多成分分析[J]. 中国药房, 2025, 36(4):414-420.
- [13] 赵伟, 陈树和, 闫斌, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别的精天颗粒质量评价[J]. 中国药房, 2025, 36(3):300-305.
- [14] 苏日塔拉图, 于佳琦, 王曦烨, 等. HPLC-DAD法同时测定蒙药森登-4汤散中7种抗风湿活性成分的含量[J]. 中国药房, 2019, 30(2):221-225.
- [15] 白埔, 萨础拉, 董玉. 蒙药复方森登-4特征图谱及其中6个指标性成分的含量测定[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(6):489-493.

(收稿日期:2024-11-29 修回日期:2025-03-19)

(编辑:唐晓莲)