

经典名方温经汤的基准样品特征图谱分析

吴革林¹, 滕菲², 杨丹², 朱童², 刘博男², 张志杰², 杜玉苹¹, 朱晶晶^{2*}

(1. 扬子江药业集团有限公司 中药研究院, 江苏泰州 225321;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700)

[摘要] 目的:建立温经汤基准样品特征图谱。方法:采用高效液相色谱法(HPLC),建立温经汤基准样品的HPLC特征图谱分析方法,在此基础上,分别采用同一品牌多根色谱柱和4种不同品牌色谱柱,3个不同厂家仪器进行了系统适应性考察,计算相对保留时间,统计不同色谱柱、不同仪器的相对保留时间偏差,并对该方法进行方法学考察。采用超高效液相色谱-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MSⁿ)对温经汤基准样品成分进行鉴别,色谱条件为ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~2.8 min, 10%A; 2.8~8.0 min, 10%~18%A; 8.0~12.2 min, 18%~25%A; 12.2~15.3 min, 25%~40%A; 15.3~17.4 min, 40%A; 17.4~20.5 min, 40%~90%A),流速0.4 mL·min⁻¹,柱温30 °C。质谱条件为电喷雾离子源,正、负离子模式扫描,检测范围 m/z 50~1 600。结果:共选取了10个共有特征峰,通过对照品比对,指认了其中8个,分别为芍药苷(1号峰),芹糖甘草苷(2号峰),甘草苷(3号峰),阿魏酸(4号峰),甘草素(6号峰),桂皮醛(8号峰),丹皮酚(9号峰)和甘草酸(10号峰)。通过质谱分析,共鉴定了30个化合物,主要包括甘草三萜皂苷类和黄酮类、人参中人参皂苷类、白芍中单萜苷类和鞣质类、牛膝中甾酮类、当归中酚酸类成分。结论:所建立的温经汤特征图谱分析方法简便稳定、重复性好,通过质谱指认及来源归属,基本明确了温经汤基准样品的物质基础,可为后续温经汤的开发和质量控制提供依据。

[关键词] 经典名方; 温经汤; 基准样品; 特征图谱; 超高效液相色谱-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MSⁿ); 相对保留时间; 质量控制

[中图分类号] R22;R28;R94;O657

[文献标识码] A

[文章编号] 1005-9903(2021)22-0007-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211769

[增强出版附件]

内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210705.1502.002.html>

[网络出版日期] 2021-07-06 9:22

Analysis of Specific Chromatogram of Wenjingtang Reference Sample

WU Ge-lin¹, TENG Fei², YANG Dan², ZHU Tong², LIU Bo-nan²,

ZHANG Zhi-jie², DU Yu-ping¹, ZHU Jing-jing^{2*}

(1. Chinese Medicine Research Institute of Yangtze River Pharmaceutical Group Co. Ltd., Taizhou 225321, China; 2. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To control the quality of the reference sample of Wenjingtang by establishing the specific chromatograms. **Method:** On the basis of analyzing 15 batches of Wenjingtang freeze-dried powder samples, a high performance liquid chromatography (HPLC) specific chromatogram analysis method of Wenjingtang was established. The system adaptability was investigated and the retention time, relative retention value and deviation caused by different chromatographic columns and instruments were calculated by using the same brand of chromatographic columns, four different brands of chromatographic columns and instruments

[收稿日期] 20210412(015)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC1701900,2018YFC1707002)

[第一作者] 吴革林, 硕士, 主管中药师, 从事中药新药质量及制剂工艺研究, Tel: 0523-86978409, E-mail: 844941526@qq.com

[通信作者] * 朱晶晶, 博士, 研究员, 从事中药药效物质基础及质量评价研究, Tel: 010-64012939, E-mail: zhuji15@163.com

from three different manufacturers. The precision, repeatability and stability of this method was further completed. The possible chemical components of the freeze-dried powders were speculated and identified by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MSⁿ). Chromatographic separation was performed on ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with acetonitrile (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) as mobile phase for gradient elution (0-2.8 min, 10%A; 2.8-8.0 min, 10%-18%A; 8.0-12.2 min, 18%-25%A; 12.2-15.3 min, 25%-40%A; 15.3-17.4 min, 40%A; 17.4-20.5 min, 40%-90%A), and column temperature was set at 30 °C with flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. Mass spectrometry was performed on electrospray ionization, data were collected under positive and negative ion modes, and the detection range was *m/z* 50-1 600. **Result:** Ten characteristic peaks were selected as the distinguishing features in this specific chromatograms, and eight of them were identified by comparing with the reference standards, including paeoniflorin (peak 1), liquiritin apioside (peak 2), liquiritin (peak 3), ferulic acid (peak 4), iquiritigenin (peak 6), cinnamaldehyde (peak 8), paeonol (peak 9) and glycyrrhizic acid (peak 10). By mass spectrometry analysis, 30 compounds were identified, and the source of medicinal materials were assigned. It mainly contained triterpenoid saponins and flavonoids from Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, ginsenosides from Ginseng Radix et Rhizoma, monoterpenoid glycosides and tannins from Paeoniae Radix Alba, steroids in Achyranthis Bidentatae Radix, phenolic acids in Angelicae Sinensis Radix. **Conclusion:** The established characteristic chromatographic analysis method of Wenjingtang is simple, stable and repeatable. The chemical composition of the freeze-dried powder of Wenjingtang is basically defined by mass spectrometry identification and source attribution, which can provide reference for the development and quality control of Wenjingtang in the future.

[Keywords] famous classical formulas; Wenjingtang; reference sample; specific chromatogram; ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MSⁿ); relative retention time; quality control

温经汤收载于《妇人大全良方》卷一调经门“月水行或不行心腹刺痛方论第十二”篇,温经汤原文记载为“当归、川芎、芍药、桂心、牡丹皮、莪术各半两,人参、甘草、牛膝各一两。右咬咀,每服五钱。水一盞半,煎至八分,去滓温服”^[1]。该方由温通散寒、活血化瘀、补养气血的药味组成,有温经散寒、活血调经、益气养血之效,全方温而不燥,攻而不伤,补而不滞,治寒邪外客所致的经闭效果显著,临床上还用于治疗寒凝血瘀型痛经,是妇科调经之要方^[2-4],温经汤临床应用广泛,具有很好的开发价值。

基准样品的制备和质量控制是经典名方制剂研究的前提和基础,建立全面、准确的基准样品质量控制体系对于保障经典名方制剂的质量具有重要意义。目前,关于温经汤基准样品的药效成分和质量控制方面的研究较少^[5],温经汤药味组成多、成分复杂,给其质量控制带来了一定难度,检测任何一种活性成分均不能代表其整体质量。高效液相色谱法(HPLC)特征图谱分析和高分辨质谱分析相结合,是目前揭示基准样品药效物质基础的重要手段^[6-9]。经系统文献考证,并结合国家中医药管理局

和国家药品监督管理局共同发布的《古代经典名方关键信息表(7首方剂)》,在明确了9味中药基原、产地、炮制规格及煎煮工艺的基础上,本研究采用随机数表法组合制备温经汤基准样品冻干粉15批,通过色谱条件优化和方法学考察,建立了温经汤基准样品HPLC特征图谱鉴别方法;同时,采用超高效液相色谱-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MSⁿ)对温经汤基准样品中的化学成分进行推测与指认,并进行了来源药材归属研究,初步明确了温经汤基准样品冻干粉的物质基础及质量传递关系,可为该经典名方的开发及质量控制提供有益借鉴。

1 材料

2695型高效液相色谱仪,2998型超高效液相色谱仪和Xevo G2-S QToF型高分辨飞行时间质谱仪(美国Waters公司);1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司),FZ102微型植物试样粉碎机(北京市光明医疗仪器有限公司),YP50002型1/100电子天平(上海越平科学仪器有限公司),MB-1-2型电炉(北京科伟永兴仪器有限公司),L3660D型台式低速离心机

(上海知信实验仪器技术有限公司), TGL-16G型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂), Lab-1A-50E型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司), XSE-105DU型1/10万电子分析天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司], BSA423S-CW型1/1万电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], 8号砂锅(江西省康舒陶瓷有限公司)。

阿魏酸、丹皮酚、甘草苷、甘草酸铵、芍药苷、桂皮醛对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为110773-201614, 110708-200506, 111610-201607,

110731-201720, 110736-201842, 110710-201821, 纯度均 $\geq 98\%$), 蔗糖甘草苷、甘草素对照品(成都埃法生物科技有限公司, 批号分别为AF8041722, AF8042721, 纯度均 $\geq 98\%$), 水为娃哈哈纯净水, 甲醇、乙腈为色谱纯, 甲酸为质谱纯, 其他试剂均为分析纯。当归、川芎、白芍等9味药材均购于其道地产地或主产区, 经中国中医科学院中药研究所生药研究中心张志杰研究员鉴定, 符合2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)的相关规定, 具体药材信息见表1。

表1 温经汤的组方药材信息

Table 1 Information on Chinese Medicinal Materials of Wenjingtang

名称	基源	拉丁学名	药用部位	采购单位	产地
当归	伞形科植物当归	<i>Angelica sinensis</i>	干燥根	岷县陇萃源中药材种植农民专业合作社	甘肃定西市岷县5批, 甘肃陇南市宕昌县5批, 甘肃甘南藏族自治州临潭县5批
川芎	伞形科植物川芎	<i>Ligusticum chuanxiong</i>	干燥根茎	什邡市隐峰镇农产品专业合作社	四川什邡市隐峰镇5批, 四川彭州市敖平镇5批, 四川眉山市谢家镇5批
白芍	毛茛科植物芍药	<i>Paeonia lactiflora</i>	干燥根	亳州市谯城区李传启中药材种植专业合作社	安徽亳州市五马镇5批、十八里镇5批, 浙江金华市磐安县5批
肉桂	樟科植物肉桂	<i>Cinnamomum cassia</i>	干燥树皮	平南县鑫葛中药材种植专业合作社	广西贵港市平南县5批, 广西防城港市上思县5批, 广东肇庆市德庆县5批
牡丹皮	毛茛科植物牡丹	<i>Paeonia suffruticosa</i>	干燥根皮	亳州市谯城区十九里镇南风中药材种植专业合作社, 山东天草药业有限公司, 铜陵禾田中药饮片股份有限公司	安徽亳州市十九里镇3批、五马镇2批, 安徽铜陵市铜陵县5批, 山东菏泽市郓城县5批
莪术	姜科植物温郁金	<i>Curcuma wenyujin</i>	干燥根茎	浙江华宇药业股份有限公司	浙江瑞安市马屿镇5批、碧山镇5批、陶山镇3批, 浙江温州市苍南县2批
人参	五加科植物人参	<i>Panax ginseng</i>	干燥根和根茎	哈尔滨雪乡中药材购销有限公司	吉林白山市抚松县3批、靖宇县2批、长白朝鲜族自治县2批, 辽宁抚顺市抚顺县3批、清原满族自治县2批, 黑龙江尚志市尚志镇3批
牛膝	苋科植物牛膝	<i>Achyranthes bidentata</i>	干燥根	武陟县康辉怀药种植专业合作社	河南焦作市武陟县5批, 内蒙古赤峰市牛家营子镇5批, 河北安国市北段村乡5批
甘草	豆科植物甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	干燥根和根茎	杭锦旗百灵中药材种植专业合作社	内蒙古呼和浩特市榆林镇5批, 内蒙古鄂尔多斯市杭锦旗呼和木独镇5批, 新疆昌吉回族自治州阜康市城关镇5批

2 方法与结果

2.1 供试样品的制备 取当归药材除去杂质, 洗净, 焯润, 切1~2 mm薄片, 干燥; 取牛膝药材除去杂质, 洗净, 焯润, 除去残留芦头, 切5~8 mm段, 干燥; 分别取当归片、牛膝段, 照2020年版《中国药典》酒炙法炒干, 得酒当归、酒牛膝, 备用。取莪术药材除去杂质, 略泡, 洗净, 蒸软, 切4 mm左右厚片, 干燥, 取莪术片, 照2005年版《安徽省中药饮片炮制规范》醋炙法, 炒至表面色变深时, 取出, 摊凉, 得醋莪术备用。取甘草药材除去杂质, 洗净, 焯润, 切4 mm左右厚片, 干燥, 取甘草片, 照2020年版《中国药典》

清炒法, 炒至表面深黄色, 微具焦斑时, 取出, 摊凉, 得炒甘草备用。分别取白芍、牡丹皮药材除去杂质, 洗净, 焯润, 切1~2 mm薄片, 干燥, 得白芍、牡丹皮饮片备用。取川芎药材除去杂质, 分开大小, 洗净, 焯润, 切4 mm左右厚片, 干燥, 得川芎饮片备用。取肉桂药材, 除去杂质及粗皮; 取人参药材除去杂质后捣碎, 得肉桂、人参饮片备用。取酒当归、川芎、白芍、肉桂、牡丹皮、醋莪术各1.67 g, 人参、炒甘草、酒牛膝各3.33 g, 粉碎机分别粉碎成黄豆粒大小颗粒, 按规定剂量取9味饮片共约20 g^[10], 加入22.5倍量水, 砂锅煎煮, 加热设备为最大功率2 kW

的电炉,5档煮沸,时间5~6 min,2.5档煎煮30 min,水煎液经九号筛(200目)过滤,煎煮液经真空冷冻干燥,得温经汤基准样品冻干粉,低温干燥保存,制备15批样品(编号S1~S15),备用。

2.2 供试品溶液的制备 取温经汤基准样品冻干粉约0.5 g,精密称定,加50%甲醇10 mL使溶解,于12 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径12.5 cm),过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷、芹糖甘草苷、甘草苷、阿魏酸、甘草素、桂皮醛、甘草酸铵、丹皮酚对照品适量,加甲醇稀释,制备成质量浓度分别为107.0, 102.0, 24.5, 120.0, 106.0, 55.2, 40.7, 56.8 mg·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.4 色谱条件

2.4.1 HPLC 检测 色谱柱有Waters C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), Kromasil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 迪马 C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), Phenomenex C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~15 min, 17%A; 15~25 min, 17%~27%A; 25~45 min, 27%~40%A; 45~55 min, 40%A),流速1 mL·min⁻¹,柱温25 °C,检测波长240 nm,进样量10 μL。

2.4.2 UPLC ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.1%

甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~2.8 min, 10%A; 2.8~8.0 min, 10%~18%A; 8.0~12.2 min, 18%~25%A; 12.2~15.3 min, 25%~40%A; 15.3~17.4 min, 40%A; 17.4~20.5 min, 40%~90%A),流速0.4 mL·min⁻¹,柱温30 °C,进样量2 μL,检测波长240 nm。

2.5 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式扫描,毛细管电压2.2 kV,锥孔电压40 V,离子源温度120 °C,脱溶剂气体流量500 L·h⁻¹,脱溶剂气温度450 °C,锥孔气体流量50 L·h⁻¹,母离子碰撞能量6 eV,碎片离子碰撞能量20~50 eV,扫描范围m/z 50~1 600。

2.6 特征图谱方法学考察

2.6.1 系统适应性考察 不同仪器系统适应性考察时,分别采用了3个不同厂家的高效液相色谱仪,精密吸取2.2项下供试品溶液10 μL,按2.4.1项下条件进样测定,分别统计不同仪器各特征峰的相对保留时间,计算相对保留时间的偏差,计算公式为偏差=|(某仪器相对保留时间-平均值)|/平均值×100%,见表2。结果显示,除LC-20AT型高效液相色谱仪检测时6号峰相对保留时间的偏差>5%,其他特征峰在3台仪器上相对保留时间的偏差均<5%,说明3台仪器重复性均良好,提示不同仪器下该方法系统适应性良好,其中2695型和1260型高效液相色谱仪重复性较好。

表2 不同品牌仪器检测时各特征峰相对保留时间的重复性

Table 2 Reproducibility of relative retention time of each characteristic peak in different brands of instruments

参数	高效液相色谱仪	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10
相对保留时间	2695型	0.634	0.913	1.000	1.094	1.664	2.149	2.529	2.716	3.017	3.138
	1260型	0.634	0.914	1.000	1.094	1.695	2.186	2.566	2.749	3.049	3.162
	LC-20AT型	0.617	0.897	1.000	1.117	1.799	2.365	2.711	2.941	3.262	3.300
偏差/%	2695型	0.955	0.551	0.000	0.726	3.200	3.762	2.806	3.069	2.959	1.938
	1260型	0.955	0.661	0.000	0.726	1.396	2.105	1.384	1.892	1.930	1.188
	LC-20AT型	1.752	1.211	0.000	1.361	4.654	5.911	4.189	4.961	4.921	3.125

不同色谱柱系统适应性考察时,对常见的几种色谱柱品牌和2种常用的色谱仪进行了比较,分别统计各特征峰的相对保留时间及其偏差,见表3。结果发现使用2695型高效液相色谱仪时,不同品牌11根色谱柱的相对保留时间偏差差异较大,但大部分色谱柱检测时特征峰的相对保留时间偏差<5%,少部分色谱柱检测时特征峰的相对保留时间偏差处于5%~10%,仅Waters品牌的3根色谱柱检测时10号特征峰的相对保留时间偏差>10%,但11根色谱柱检测时各特征峰分离度良好、出峰顺序一致。

同品牌不同色谱柱之间的各特征峰相对保留时间偏差见表4,结果发现同品牌色谱柱的各特征峰相对保留时间偏差均<5%,说明使用同一品牌色谱柱其相对保留时间重复性良好。其中,Kromasil色谱柱的分离度、重复性均较好,可作为首选。

因在2695型高效液相色谱仪下同一品牌3根色谱柱检测时,各特征峰相对保留时间偏差均<5%,故在1260型高效液相色谱仪下,相同品牌色谱柱之间不再进行比较,只选择每个品牌1根色谱柱进行比较,统计各特征峰的相对保留时间及其偏差,见

表3 2695型高效液相色谱仪用不同品牌色谱柱检测时各特征峰相对保留时间的重复性

Table 3 Reproducibility of relative retention time of each characteristic peak detected by different brand HPLC column in Waters 2695

参数	色谱柱	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10
相对保留时间	Waters-1	0.641	0.919	1.000	1.074	1.743	2.312	2.763	2.867	3.172	3.857
	Waters-2	0.640	0.919	1.000	1.077	1.758	2.329	2.786	2.885	3.213	3.916
	Waters-3	0.637	0.919	1.000	1.079	1.729	2.290	2.728	2.846	3.160	3.736
	Kromasil-1	0.634	0.913	1.000	1.094	1.664	2.149	2.529	2.716	3.017	3.138
	Kromasil-2	0.631	0.914	1.000	1.088	1.637	2.098	2.463	2.649	2.940	3.044
	Kromasil-3	0.636	0.912	1.000	1.099	1.674	2.149	2.522	2.721	3.019	3.116
	迪马-1	0.626	0.914	1.000	1.103	1.646	2.130	2.493	2.694	2.988	3.139
	迪马-2	0.633	0.909	1.000	1.113	1.698	2.200	2.580	2.798	3.113	3.201
	迪马-3	0.626	0.913	1.000	1.104	1.651	2.138	2.500	2.705	3.000	3.174
	Phenomenex-1	0.627	0.915	1.000	1.101	1.596	2.086	2.431	2.555	2.831	3.094
	Phenomenex-2	0.623	0.918	1.000	1.094	1.570	2.055	2.389	2.506	2.778	3.055
	偏差/%	Waters-1	1.424	0.437	0.000	1.738	4.434	6.250	7.845	5.327	4.998
Waters-2		1.266	0.437	0.000	1.464	5.333	7.031	8.743	5.988	6.356	18.130
Waters-3		0.791	0.437	0.000	1.281	3.595	5.239	6.479	4.555	4.601	12.700
Kromasil-1		0.316	0.219	0.000	0.091	0.300	1.241	1.288	0.220	0.132	5.340
Kromasil-2		0.158	0.109	0.000	0.457	1.917	3.585	3.864	2.682	2.681	8.175
Kromasil-3		0.633	0.328	0.000	0.549	0.300	1.241	1.561	0.037	0.066	6.003
迪马-1		0.949	0.109	0.000	0.915	1.378	2.114	2.693	1.029	1.092	5.309
迪马-2		0.158	0.656	0.000	1.830	1.738	1.103	0.703	2.792	3.045	3.439
迪马-3		0.949	0.219	0.000	1.006	1.078	1.746	2.420	0.625	0.695	4.253
Phenomenex-1		0.791	0.000	0.000	0.732	4.374	4.136	5.113	6.135	6.289	6.667
Phenomenex-2		1.424	0.328	0.000	0.091	5.932	5.561	6.753	7.935	8.043	7.843

表4 2695型高效液相色谱仪用同品牌色谱柱检测时各特征峰相对保留时间的偏差

Table 4 Deviation of relative retention time of each characteristic peak detected by Waters 2695 with the same brand column %

色谱柱	峰1	峰2	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10
Waters-1	0.313	0.000	0.279	0.000	0.087	0.145	0.035	0.314	0.547
Waters-2	0.156	0.000	0.000	0.861	0.823	0.979	0.663	0.974	2.086
Waters-3	0.313	0.000	0.186	0.803	0.866	1.124	0.698	0.691	2.607
Kromasil-1	0.000	0.000	0.000	0.362	0.797	0.958	0.779	0.836	1.258
Kromasil-2	0.473	0.110	0.548	1.267	1.595	1.677	1.707	1.738	1.775
Kromasil-3	0.315	0.110	0.457	0.965	0.797	0.679	0.965	0.902	0.549
迪马-1	0.318	0.219	0.361	1.141	1.206	1.228	1.391	1.516	1.009
迪马-2	0.796	0.329	0.542	1.982	2.041	2.219	2.416	2.604	0.946
迪马-3	0.318	0.110	0.271	0.841	0.835	0.951	0.988	1.121	0.095
Phenomenex-1	0.320	0.218	0.273	0.821	0.724	0.871	0.948	0.927	0.618
Phenomenex-2	0.320	0.109	0.364	0.821	0.773	0.871	0.988	0.963	0.650

注:峰3的相对保留时间偏差均为0。

表5,结果发现1260型高效液相色谱仪采用不同品牌的色谱柱检测时,各特征峰相对保留时间的偏差

均<5%,说明重复性良好。

2.6.2 精密度考察 精密吸取同一供试品溶液(样品S2),按2.4.1项下条件连续进样6次(2695型高效液相色谱仪,Kromasil C₁₈色谱柱,下同),以峰面积较大、较稳定的3号色谱峰作为参照峰,计算各特征峰相对保留时间的RSD处于0.03%~0.3%。

2.6.3 稳定性考察 精密吸取同一供试品溶液(样品S2),分别于制备后0,2,4,6,10,12,24,48 h按2.4.1项下条件测定,以峰面积较大、较稳定的3号色谱峰作为参照峰,计算各特征峰相对保留时间的RSD处于0.1%~0.7%,表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.6.4 重复性考察 取同一批温经汤基准样品冻干粉(样品S2),按2.2项下方法制备供试品溶液6份,按2.4.1项下条件进样测定,以峰面积较大、较稳定的3号色谱峰作为参照峰,计算各特征峰相对保留时间的RSD处于0.07%~0.7%,表明该方法重复性良好。

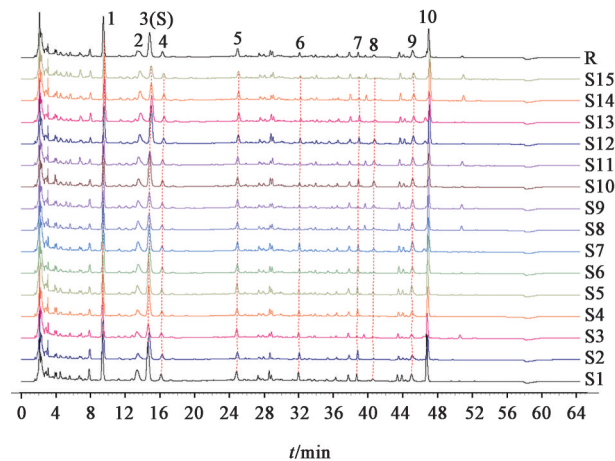
表5 1260型高效液相色谱仪用不同品牌色谱柱检测时各特征峰相对保留时间的重复性

Table 5 Reproducibility of relative retention time of each peak detected by Agilent 1260 with different brand column

参数	色谱柱	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10
相对保留时间	Waters-1	0.622	0.936	1.000	1.039	1.644	2.166	2.576	2.651	2.941	3.180
	Kromasil-1	0.634	0.914	1.000	1.094	1.695	2.186	2.566	2.749	3.049	3.162
	迪马-1	0.629	0.917	1.000	1.097	1.662	2.165	2.425	2.723	3.017	3.174
	Phenomenex-1	0.630	0.917	1.000	1.097	1.616	2.119	2.438	2.575	2.854	3.128
偏差/%	Waters-1	1.113	1.629	0.000	3.974	0.605	0.324	2.999	0.897	0.809	0.601
	Kromasil-1	0.795	0.760	0.000	1.109	2.479	1.251	2.599	2.766	2.833	0.316
	迪马-1	0.040	0.434	0.000	1.386	0.484	0.278	3.039	1.794	1.754	0.411
	Phenomenex-1	0.159	0.434	0.000	1.386	2.297	1.853	2.519	3.738	3.744	1.044

2.7 特征图谱分析

2.7.1 特征图谱生成 取15批温经汤基准样品冻干粉的供试品溶液和混合对照品溶液,按2.4.1项下条件测定,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)软件对样品特征图谱进行分析。以样品S1的特征图谱作为参照谱进行指纹匹配(中位数法,时间窗0.1 min),确定了10个特征峰,见图1。



R. 对照特征图谱;3(S). 甘草苷

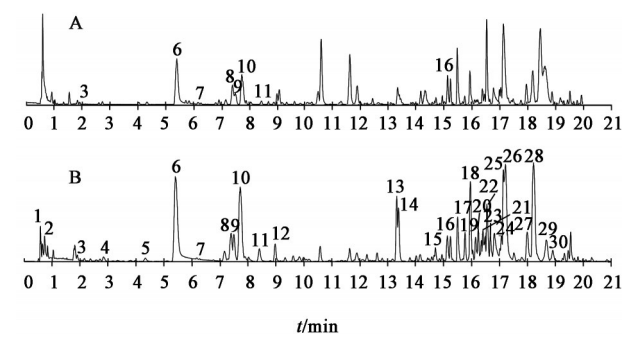
图1 15批温经汤基准样品的HPLC特征谱

Fig. 1 Overlay specific chromatograms of 15 batches of Wenjingtang reference samples

2.7.2 色谱峰的指认及归属 通过与对照品比较,指认了其中8个特征峰,分别为芍药苷(1号峰),蔗糖甘草苷(2号峰),甘草苷(3号峰),阿魏酸(4号峰),甘草素(6号峰),桂皮醛(8号峰),丹皮酚(9号峰),甘草酸(10号峰)。经保留时间、紫外吸收光谱比对,其中1号峰来自白芍和牡丹皮;2,3,6,10号峰均来自甘草;4号峰来自当归和川芎,9号峰来自牡丹皮,8号峰来自肉桂。综合15批基准样品各特征峰的相对保留时间(数据详见网络附件材料),确定了温经汤基准样品特征图谱鉴别标准,具体建议为

供试品特征图谱中有10个特征峰,3号峰甘草苷作为参照峰,各特征峰与参照峰的相对保留时间,其偏差应在规定值的 $\pm 10\%$ 之内。各色谱峰相对保留时间的规定值为0.640(峰1),0.907(峰2),1.000(峰3),1.101(峰4),1.687(峰5),2.169(峰6),2.626(峰7),2.749(峰8),3.051(峰9),3.173(峰10)。

2.7.3 温经汤基准样品的化学成分指认 采用UPLC-Q-TOF-MSⁿ对温经汤基准样品冻干粉、水煎液及各味饮片的化学成分进行推测,按2.4.2和2.5项下条件测定,见图2。查阅文献[11-16]并结合对照品指认,鉴定了30个化合物,见表6。结果发现温经汤主要含有甘草中的三萜皂苷类和黄酮类,人参中的人参皂苷类,白芍中的单萜苷类、鞣质类,牛膝中甾酮类,当归中酚酸类等成分,初步明确了温经汤水煎液和基准样品冻干粉中的主要物质基础。



A. 正离子模式;B. 负离子模式

图2 温经汤的UPLC-Q-TOF-MSⁿ总离子流

Fig. 2 Total ion chromatograms of Wenjingtang by UPLC-Q-TOF-MSⁿ

3 讨论

3.1 方法学考察 在方法优化过程中,开展了重复性考察工作。分别考察了3个厂家高效液相色谱仪的系统适应性,结果发现2695型和1260型高效液相色谱仪重复性均较好,二者相对保留时间的偏差

表6 温经汤中化学成分的UPLC-Q-TOF-MSⁿ鉴定

Table 6 Chemical components in Wenjingtang identified by UPLC-Q-TOF-MSⁿ

No.	t _R /min	化合物	分子式	正离子	负离子	来源
1	0.582	蔗糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-	387.114 6, 377.085 6, 341.108 8, 179.055 8	白芍
2	0.731	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	-	111.008 8	当归
3	1.884	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.103 8, 163.040 8, 145.031 5	353.087 7, 191.056 2, 165.055 5, 137.023 9	当归
4	2.837	香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	-	167.034 6, 123.044 5	当归
5	4.324	芍药内酯苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	-	165.055 2, 121.029 2	白芍
6	5.419	芍药苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	503.153 4, 179.072 1, 151.072 2	525.162 7, 449.145 0, 327.108 8, 165.055 6, 121.029 7	白芍、 牡丹皮
7	6.166	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.067 2, 179.072 7, 149.025 5	193.050 7, 121.029 7	当归、 川芎
8	7.396	甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.134 4, 257.082 6, 137.025 2	417.118 7, 255.066 0, 135.008 6	甘草
9	7.496	甘草苷元-7-O-芹糖-4'-O-葡萄糖苷	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	551.176 8, 419.135 8, 257.082 7, 137.025 3	549.160 8, 429.104 3, 255.066 3	甘草
10	7.716	芹糖异甘草苷	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	551.175 7, 419.133 9, 257.082 4, 137.025 0	549.161 9, 255.066 5, 135.008 6	甘草
11	8.406	没食子酰芍药苷	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	655.164 7, 537.231 3, 375.179 1, 315.072 3, 153.020 0	631.166 6, 613.155 5, 491.118 0, 313.055 9, 169.014 1	白芍
12	8.976	β-蜕皮甾酮	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	-	525.306 6, 479.301 6, 319.191 6, 255.066 5, 159.102 4	牛膝
13	13.329	人参皂苷 R _{g1}	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	-	845.490 2, 799.485 3, 637.432 3, 475.378 8	人参
14	13.386	人参皂苷 Re	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	-	991.553 0, 945.542 2, 799.484 3, 637.431 8, 475.378 2	人参
15	14.717	甘草皂苷 G ₂	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	-	837.390 7, 351.056 0, 193.034 7	甘草
16	15.136	苯甲酰芍药苷	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	607.178 6, 543.129 5, 267.088 2, 179.072 1	629.187 1, 553.170 8, 351.055 9, 193.049 6, 121.029 4	白芍
17	15.769	人参皂苷 Rf	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	-	845.490 1, 799.484 3, 637.430 9, 475.378 4	人参
18	15.961	乌拉尔皂苷 N	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	-	837.392 2, 351.057 6, 193.035 8	甘草
19	16.153	人参皂苷 Rb ₁	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	-	1 153.602 1, 1 107.597 7, 945.543 6, 837.392 4	人参
20	16.245	西洋参皂苷 R ₁	C ₅₆ H ₉₄ O ₂₄	-	1 149.605 1, 1 107.595 0, 1 089.576 7, 945.541 0, 823.411 3	人参
21	16.352	人参皂苷 Rb ₂ /Rb ₃	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	-	1 123.592 0, 1 077.588 5, 945.545 5, 783.491 8	人参
22	16.552	羟基甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	-	837.392 2, 351.057 1, 193.035 6	甘草
23	16.829	未知	-	-	953.437 6, 837.389 6, 793.435 9, 351.056 1	牛膝
24	17.078	未知	-	-	955.452 9, 835.448 4, 793.437 7, 631.384 2	牛膝
25	17.142	甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	-	821.398 2, 351.057 7, 193.035 8	甘草
26	17.220	乌拉尔甘草皂苷 B	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	-	821.396 3, 351.057 0, 193.035 6, 113.024 7	甘草
27	17.995	甘草皂苷 B ₂	C ₄₂ H ₆₁ O ₁₅	-	807.417 2, 351.056 7, 193.035 1, 113.024 6	甘草
28	18.223	甘草皂苷 H ₂	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	-	821.396 8, 351.057 6, 193.035 6, 113.024 5	甘草
29	18.686	甘草皂苷 K ₂	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	-	821.395 9, 351.056 2, 193.034 9, 113.024 1	甘草
30	18.906	甘草皂苷 J ₂	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆	-	823.411 1, 351.055 6, 193.034 8, 113.024 2	甘草

均<5%,说明该方法的仪器系统适应性良好;考察了4个不同品牌色谱柱的系统适应性,在2695型高效液相色谱仪下,4个品牌11根色谱柱检测时,各特征峰相对保留时间比较稳定(除Waters色谱柱10号峰相对保留时间偏差>10%,其余色谱柱的相对保留时

间偏差均在10%以内),且各特征峰分离度和重复性较好,不存在出峰顺序改变的现象;同一品牌不同色谱柱检测时,各特征峰相对保留时间偏差均<5%,表明该方法下色谱柱的系统适应性良好;精密性、稳定性、重复性试验中各特征峰相对保留时间

的RSD均<1%,表明该方法稳定性和重复性良好。

3.2 特征峰及检测波长的选择 本研究在选择评价指标(特征峰)和检测波长(240 nm)时,坚持君臣佐使多药味兼顾的原则,尽可能覆盖多种类型成分的紫外吸收,以达最大鉴别功能。本文一共选择了10个色谱峰作为特征峰,作为温经汤的定性鉴别及质量控制依据。通过与对照品比较,指认了其中的8个特征峰,其中包括君药肉桂的主要有效成分桂皮醛(8号峰);臣药当归、川芎的主要有效成分阿魏酸(4号峰);佐药白芍、牡丹皮的主要有效成分芍药苷(1号峰)和丹皮酚(9号峰);使药甘草的主要有效成分甘草苷(3号峰)和甘草酸(10号峰)等,以上成分为2020年版《中国药典》每味中药规定的指标性成分或活性成分^[17-22]。

3.3 化学成分的指认 本文采用对温经汤基准样品冻干粉、水煎液及各味饮片的化学成分进行了指认,就单味药材、饮片、水煎液中间体、基准样品冻干粉、对照品5个样品中的目标峰(见增强出版附件材料),进行紫外吸收特征和出峰时间双重比对,以保证准确指认,鉴定了30个化合物,结果发现温经汤主要含甘草的三萜皂苷类和黄酮类成分、人参中人参皂苷类、白芍中单萜苷类和鞣质类、牛膝中甾酮类、当归中酚酸类等成分,初步明确了温经汤水煎液或基准样品冻干粉中的主要物质基础。总之,本研究采用HPLC建立了温经汤基准样品特征图谱定性鉴别方法,并运用质谱技术指认了其中的30个化学成分,该特征图谱定性鉴别方法简便、快速、实用,可为温经汤的研发与质量控制奠定基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 陈自明. 妇人大全良方[M]. 北京:人民卫生出版社, 1992:31-50.
[2] 夏桂成. 实用妇科方剂学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1997:98-103.
[3] 罗元恺. 中医妇科学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1986:41-45.
[4] 段富津. 方剂学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1995:202-208.
[5] 赵娟,谢世静,赵兴华,等. 中药指纹图谱质控方法研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(1):82-86.
[6] 郑振兴,胡瀚文,曾利,等. 基于HPLC指纹图谱结合化学计量学评价不同产地佛手药材质量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21):174-180.
[7] 王美华,赵邯涛,潘梦雪,等. 益胃汤物质基准的

HPLC指纹图谱分析及多组分含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17):9-15.

[8] 孟岩,李焜仪,单家明,等. 经典名方小承气汤物质基准的HPLC指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4):130-136.
[9] 冯碧,宋娇,慈志敏,等. 小金丸脂溶性和水溶性部位的HPLC指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(18):139-144.
[10] 国家中医药管理局,国家药品监督管理局. 关于发布《古代经典名方关键信息考证原则》《古代经典名方关键信息表(7首方剂)》的通知[EB/OL]. (2020-11-10) [2021-03-16]. [http://kjs. satcm. gov. cn/zhengcewenjian/2020-11-10/18132. html](http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-11-10/18132.html).
[11] 荔淑楠,王引权,王富胜,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术的不同品种当归代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(8):138-147.
[12] 张翠英,章洪,任伟光,等. UPLC-MS/MS测定丹参川芎对药中4种酚酸类成分在大鼠血浆和心脏组织的药代动力学[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(19):4257-4262.
[13] 段伟萍,李缘媛,郑云枫,等. 基于LC-MS/MS法分析生、炙甘草中水溶性成分[J]. 中成药, 2020, 42(5):1237-1243.
[14] 赵立春,王玉方,刘继永. 人参中28种人参皂苷含量的UPLC-MS/MS同时检测[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9):2099-2102.
[15] 陶益,杜映姗,黄苏润,等. 牛膝不同炮制品中化学成分的UPLC-Q-TOF/MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12):1-5.
[16] 陈菲菲,钱大玮,郭盛,等. 基于UPLC-MS的牡丹皮药材质量评价研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(4):609-617.
[17] 侯小涛,郝二伟,秦健峰,等. 肉桂的化学成分、药理作用及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药, 2018, 49(1):20-34.
[18] 刘娟汝,刘雨诗,刘红梅,等. 川芎不同部位及不同加工方法的川芎饮片中挥发油含量及化学成分对比[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(5):101-107.
[19] 夏青松,孔靖玮,李德顺,等. 不同配比当归-川芎药对的抗炎、镇痛作用实验研究[J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(6):1-4.
[20] 张利. 白芍的药理作用及现代研究进展[J]. 中医临床研究, 2014, 6(29):25-26.
[21] 胡云飞,徐国兵. 牡丹皮及其主要成分丹皮酚的药理作用研究进展[J]. 安徽医药, 2014, 18(4):589-592.
[22] 冯月,吴文夫,魏建华,等. 甘草酸及甘草苷的提取纯化方法和药理作用研究进展[J]. 人参研究, 2012, 24(3):46-50.

[责任编辑 刘德文]