

· 药学基础 ·

DESI-MSI 在半夏泻心汤质量控制中的应用

孙博^{1,2}, 赵一帆², 朱广伟^{2*}, 张东², 曲缘章^{2,3}, 常阿倩^{2,4}, 徐腾腾^{2,3}, 张翠^{1,5*}

- (1. 哈尔滨商业大学, 哈尔滨 150076; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
3. 山东中医药大学, 济南 250355; 4. 北京中医药大学, 北京 100102;
5. 江西青峰药业有限公司 创新天然药物与中药注射剂国家重点实验室, 江西 赣州 341000)

[摘要] 目的: 制备不同产地 15 批次半夏泻心汤物质基准及对应实物, 分别应用超高效液相色谱-二极管阵列检测器检测法(UHPLC-DAD)与解吸电喷雾电离-敞开式离子化质谱成像技术(DESI-MSI 技术)对不同产地 15 批次半夏泻心汤对应实物进行分析, 考察 DESI-MSI 在经典名方质量控制中的优势。方法: 以半夏泻心汤为研究模型, 采用 UHPLC-DAD 建立半夏泻心汤物质基准及对应实物指纹图谱, 并对指标成分含量、出膏率进行考察。同时, 以半夏泻心汤对应实物冻干粉为研究载体, 将其复溶后以 5 μL 定量毛细管点样于定性滤纸, 并固定于载玻片制成样本, 以甲醇-甲酸(1 000:1)为喷雾溶剂, 流量 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 扫描范围 100~1 200 Da, 空间分辨率 300 μm , 喷雾电压 3 kV, 采样锥电压 ± 40 V, 喷雾器(N_2)压力 0.5 MPa, 喷雾器入射角 60 度, 收集角 10 度, 离子源温度 120 $^\circ\text{C}$, 正、负离子全扫描样本。结果: DESI-MSI 能检测到指标成分甘草苷、黄酮苷、汉黄芩苷, 及共有峰芹糖基甘草苷、小檗碱、甘草酸等, 并对其半定量分析, 分析结果与 UHPLC-DAD 基本一致。同时, DESI-MSI 还能检测来自甘草、黄连、黄芩、大枣和人参的甘草皂苷 G_2 , 巴马汀, 黄连碱, 芦丁, 人参皂苷 R_g 等 16 种成分, 并对其相对含量进行直观呈现, 定性分析能力远强于 UHPLC-DAD。结论: DESI-MSI 技术无需进行复杂的样品处理过程, 且灵敏度高、分析能力强, 可以在无对照品情况下进行复杂样品的定性和相对含量分析, 可作为经典名方物质基准、对应实物及配方颗粒样品的质控手段。

[关键词] 经典名方; 半夏泻心汤; 质谱成像(MSI); 物质基准; 对应实物; 质量控制; 半定量分析

[中图分类号] R22; O657; R28; C37; R914 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)07-0117-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192350

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190813.1327.001.html>

[网络出版时间] 2019-08-13 13:56

Application of DESI-MSI in Quality Control of Banxia Xiexintang

SUN Bo^{1,2}, ZHAO Yi-fan², ZHU Guang-wei^{2*}, ZHANG Dong², QU Yuan-zhang^{2,3},

CHANG A-qian^{2,4}, XU Teng-teng^{2,3}, ZHANG Cui^{1,5*}

(1. Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

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

3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250355, China;

4. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

5. State Key Laboratory of Innovative Natural Medicine and TCM Injections, Jiangxi Qingfeng Pharmaceutical Co. Ltd., Ganzhou 341000, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare 15 batches of Banxia Xiexintang substance benchmark and lyophilized

[收稿日期] 20190621(009)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09721005); 国家重点研发计划项目(2018YFC1706500); 创新天然药物与中药注射剂国家重点实验室开放课题(QFSKL2018005)

[第一作者] 孙博, 硕士, 从事中药质量标准以及经典名方、配方颗粒研究, E-mail: sunsysx96777@qq.com

[通信作者] *朱广伟, 博士, 助理研究员, 从事中药质量标准以及经典名方、配方颗粒研究, E-mail: gwzhu@icmm.ac.cn;

*张翠, 博士, 教授, 从事中药方剂学研究, E-mail: zhangcui1ulu@163.com

powder from different places, and the lyophilized powder was analyzed by ultra-high performance liquid chromatography with diode array detection (UHPLC-DAD) and desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging (DESI-MSI) in order to investigate the advantages of DESI-MSI in quality control of famous classical formulas. **Method:** Taking Banxia Xiexintang as the research model, fingerprints of the substance benchmark and lyophilized powder were established by UHPLC-DAD, and the content of index components and the yield of dry extract were also investigated. Meanwhile, as the research carrier, the lyophilized powder corresponding to Banxia Xiexintang was dissolved in methanol and dotted on qualitative filter paper with 5 μL quantitative capillary, and fixed it on the slide to make samples. The samples were analyzed on a DESI-MSI system in positive and negative ion mode with methanol-formic acid (1 000 : 1, flow rate of 3 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) as spray solvent, N_2 as spray gas (pressure of 0.5 MPa). The scanning range was 100-1 200 Da, the spatial resolution was 300 μm , the spray voltage was 3 kV, the sampling cone voltage was ± 40 V, incidence angle of sprayer was 60 degree, its collection angle was 10 degree, the ion source temperature was 120 $^\circ\text{C}$. **Result:** DESI-MSI could not only detect the index components of liquiritin, baicalin and wogonoside, as well as the common peaks of liquiritin apioside, berberine and glycyrrhizic acid, but also analyzed them semi-quantitatively, the analysis results were basically consistent with UHPLC-DAD. At the same time, DESI-MSI could detect 16 other components from Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, Coptidis Rhizoma, Scutellariae Radix, Jujubae Fructus and Ginseng Radix et Rhizoma, such as licoricesaponin G_2 , palmatine, coptisine, rutin and ginsenoside Rg_1 , and present their relative content visually. The qualitative analysis ability of DESI-MSI was much better than UHPLC-DAD. **Conclusion:** DESI-MSI can be used as the quality control method for substance benchmark and lyophilized powder and dispensing granules of famous classical formulas with advantages of high sensitivity, strong analytical ability, no complex sample processing, qualitative and relative content analysis of complex samples without reference substance.

[**Key words**] famous classical formulas; Banxia Xiexintang; mass spectrometry imaging (MSI); substance benchmark; corresponding objects; quality control; semi-quantitative analysis

半夏泻心汤源自汉·张仲景《伤寒论·辨太阳病脉证并治下》记载：“若心下满而鞭痛者，此为结胸也，大陷胸汤主之。但满而不痛者，此为痞，柴胡不中与之，宜半夏泻心汤。”该复方以半夏半升(洗)，黄芩、干姜、人参、甘草(炙)各三两，黄连一两和大枣十二枚(擘)配伍，具有调和肝脾、寒热平调、消痞散结之功效^[1-3]，临床疗效确切^[4]，作为入选《古代经典名方目录(第一批)》的方剂之一，其工艺及质量控制研究对于后续经典名方的开发具有一定的指导意义^[5-6]。

高分辨质谱已被广泛应用于中药化学领域，通过对中药化学成分进行定性与定量研究，可全面展现中药及其复方的药效成分，不仅可为药理学研究提供合理参考，还可为中药质量控制体系的构建提供关键依据^[7]。质谱成像(MSI)作为一种新型分子成像技术，近年来多应用于药物及其代谢物体内分布研究，利用激光或离子束使样本表面分子离子化，通过串联质谱测定离子化分子质荷比，直接从动物组织切片表面获得药物及其代谢物在体内的分子组成、相对丰度与空间分布状况，并以彩色图像的形式

表达^[8-15]。如王中华等^[16]应用敞开式空气动力辅助离子化-超高分辨质谱成像技术对大鼠肾脏组织切片进行成像分析，得到了 38 种肾脏内源性产物在组织中的特异性分布，直观体现了与肾脏渗透压梯度形成有关的多种小分子代谢物皮质-髓质轴向分布特征。

本实验选择经典名方半夏泻心汤为研究对象，参考《伤寒论》原文记载的古代制备工艺制备 15 批半夏泻心汤物质基准，建立基于 UHPLC 的半夏泻心汤物质基准及对应实物指纹图谱分析方法，确定出膏率范围，同时，建立了基于解吸电喷雾电离-敞开式离子化质谱成像技术的经典名方质量控制方法，对多组分进行定性与定量分析，为经典名方整体质量控制研究提供新思路和新方法。

1 材料

1290 Infinity II 型超高效液相色谱仪[美国安捷伦公司，包括 G7167B 型自动进样系统，G7166B 型柱温箱，G7117A 型二极管阵列检测器(DAD)]，Xevo G2-XS QTOF 型质谱成像系统(美国 Waters 公司)，BS-210S 型电子分析天平(北京赛多利斯天平

有限公司), LD510-2 型电子天平(沈阳龙腾电子有限公司), H1650-W 型台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), SX610 型高精度笔式 pH 计(上海三信仪表厂), LGJ-10E 型冷冻真空干燥机[四环福瑞科仪科技发展(北京)有限公司], SKG-1601 型电陶炉(广东艾诗凯奇智能科技有限公司)。

盐酸巴马汀, 盐酸小檗碱, 盐酸黄连碱, 表小檗碱, 异甘草素, 甘草次酸, 异甘草苷, 芹糖基甘草苷, 甘草酸, 甘草素, 人参皂苷 Rg₁, 人参皂苷 Rg₂, 人参皂苷 Re, 人参皂苷 Rb₁, 人参皂苷 Rb₂, 新甘草苷对照品(成都普菲德生物技术有限公司, 批号分别为 17122202, 17010202, 18110905, 17091401, 18020601, 18032101, 17083003, 17041004, 1701302, 17033104, 17072503, 18022805, 14081201, 15061101, 15031701, 15101301, 纯度除黄芩苷 ≥

96% 外, 其余均 ≥98%); 甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 L63P-J7XV, UQYK-Q6EZ, RV9T-NCM7, 纯度依次为 93.1%, 93.5%, 98.5%), 水为娃哈哈纯净水, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。半夏泻心汤所用饮片均由盛实百草药业有限公司提供, 经哈尔滨商业大学药学院张翠教授鉴定, 饮片所用药材分别为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* 的干燥块茎, 五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根及根茎, 唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根茎, 毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎, 姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的干燥根茎, 豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的炮制加工品, 鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* 的干燥成熟果实, 其他详细信息见表 1。

表 1 半夏泻心汤物质基准的药材来源

Table 1 Source of medicinal materials in substance benchmark of Banxia Xiexintang

No.	黄芩		干姜		人参		黄连		大枣		炙甘草	
	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地
1	H1802370	山西	S174090	贵州	H1701040	吉林	S173380	四川	H1800750	山东	H180545	内蒙古
2	H1801730	山西	S181660	广西	H1701010	吉林	S174380	湖北	H1700310	山西	H180158	内蒙古
3	H1701450	山东	S181130	云南	H1801750	吉林	W170030	四川	H1700400	河北	H180067	甘肃
4	H1800050	河北	S180080	广西	H1801760	黑龙江	S173200	湖北	H1700330	山西	H180160	内蒙古
5	H1700490	山西	S181140	云南	H1802640	吉林	S173180	四川	H1800470	河北	H180215	内蒙古
6	H1700440	山东	S181150	云南	H1802620	吉林	S173190	湖北	H1700420	河北	H170174	内蒙古
7	H1700840	山西	S180090	广西	H1801900	吉林	S173570	四川	H1700410	河北	H170005	内蒙古
8	H1700850	河北	S181670	广西	H1701030	吉林	S174360	湖北	H1701440	山西	H170006	内蒙古
9	H1700250	山东	S182040	云南	H1801910	吉林	S173220	湖北	H1700370	山东	H180543	内蒙古
10	H1700500	山西	S182110	云南	H1801890	吉林	S173170	湖北	H1701860	山东	H180544	内蒙古
11	H1700560	内蒙古	S182150	广西	H1802630	吉林	S173210	湖北	H1800010	河北	H170001	内蒙古
12	H1700450	山东	S181370	广西	H1801920	吉林	S174370	湖北	H1700380	山东	H170004	内蒙古
13	H1700430	山东	S174140	云南	H1801740	吉林	S172870	四川	H1800730	山东	H180159	内蒙古
14	H1700510	山西	S180060	广西	H1701710	吉林	S173560	四川	H1800740	山东	H170003	内蒙古
15	H1700830	陕西	S182130	贵州	H1802790	吉林	S172860	湖北	H1700320	山西	H170002	内蒙古

注:第 1~15 批半夏的产地均为贵州,批号分别为 H180659, H180655, H180658, H180657, H180417, H180652, H180651, H180654, H180653, H180019, H180662, H180742, H180660, H180764, H180763。

2 方法与结果

2.1 半夏泻心汤的物质基准研究

2.1.1 对照品溶液的制备 取甘草苷对照品适量,精密称定 10.1 mg 于 10 mL 量瓶中,加 70% 乙醇定容,得甘草苷对照品溶液;精密称定在 60 °C 减压干燥 4 h 的黄芩苷对照品 19.8 mg 于 10 mL 量瓶中,加甲

醇定容,得黄芩苷对照品溶液;精密称定汉黄芩苷对照品 7.8 mg 于 20 mL 量瓶中,加甲醇与微量二甲基亚砜(DMSO)溶液定容,得汉黄芩苷对照品溶液。

2.1.2 物质基准及供试品溶液的制备 依据《伤寒论》原文以及文献[17],取半夏半升(12 g),黄芩、干姜、人参、炙甘草各三两(9 g),黄连一两

(3 g), 大枣(擘)十二枚(4 枚), 按处方置于煎药锅中, 根据书中记载加水 1 斗(1 斗 = 10 升 = 200 mL) 并置于电陶炉上。电陶炉功率调至最高档加热至沸腾, 再调至中火, 将药液煎煮至六成时用 100 目筛网趁热过滤并舍弃药渣, 剩余药液继续大火加热浓缩至一半, 再用 100 目筛网趁热过滤, 即得半夏泻心汤物质基准, 分别编号 01 ~ 15。精密吸取半夏泻心汤物质基准 0.8 mL, 加入甲醇 0.8 mL, 涡旋, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 得供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 Thermo Accucore C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 150 mm, 2.6 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 15% B; 10 ~ 13 min, 15% ~ 21% B; 13 ~ 15 min, 21% ~ 22% B; 15 ~ 16.5 min, 22% ~ 23% B; 16.5 ~ 20 min, 23% ~ 25% B; 20 ~ 21 min, 25% ~ 44% B; 21 ~ 22 min, 44% ~ 48% B; 22 ~ 23.5 min, 48% ~ 51% B; 23.5 ~ 25.5 min, 51% ~ 59% B; 25.5 ~ 26.5 min, 59% ~ 65% B; 26.5 ~ 32.5 min, 65% ~ 90% B), 柱温 30 ℃, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 2 μL, 检测波长 237 nm(甘草苷)和 280 nm(黄芩苷和汉黄芩苷)。

2.1.4 方法学考察 精密吸取甘草苷对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 加 70% 乙醇溶液定容至刻度, 按 2.1.3 项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 得回归方程 $Y = 4\ 853.2X + 7.105\ 3$ ($R^2 = 0.999\ 4$), 线性范围 0.038 ~ 0.188 μg; 精密吸取黄芩苷对照品溶液 0.2, 0.5, 1.0, 1.25, 2.0 mL, 汉黄芩苷对照品溶液 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中并加甲醇定容, 其余操作同甘草苷, 得回归方程分别为 $Y = 9\ 055.7X - 232.16$ ($R^2 = 0.997\ 9$), $Y = 10\ 268X - 551.27$ ($R^2 = 0.999\ 5$), 线性范围依次为线性范围 0.148 ~ 1.481, 0.075 ~ 0.749 μg。取同一批半夏泻心汤物质基准供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 0.2%, 0.1%, 表明仪器精密度良好。精密称取半夏泻心汤饮片适量, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 分别于配制后 0, 2, 8, 10, 23, 24 h 按 2.1.3 项下色谱条件测定, 计算甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 1.4%, 1.1%, 1.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。精密称取同一批半夏泻心汤各药味饮片适量, 按 2.1.2 项下方法平行制备 6 批物质基准供试品溶液, 按照 2.1.3 项下色谱

条件测定, 计算甘草苷、黄芩苷以及汉黄芩苷的平均质量浓度分别为 0.09, 1.09, 0.26 g·L⁻¹, RSD 依次为 2.9%, 1.7%, 3.1%, 表明该方法重复性良好。精密吸取已知各指标成分含量的半夏泻心汤物质基准, 分别加入等量的甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷对照品, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件测定, 结果三者的平均加样回收率分别为 96.4%, 97.4%, 94.7%, RSD 依次为 4.5%, 2.0%, 1.9%。

2.1.5 样品测定 精密吸取 2.1.2 项下供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件测定, 计算物质基准中甘草苷、黄芩苷以及汉黄芩苷含量, 见表 2。

2.1.6 半夏泻心汤物质基准指纹图谱研究 将 2.1.5 项下物质基准色谱信息输入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)进行分析, 设定半夏泻心汤物质基准 01 为参照图谱, 全谱峰匹配, 见图 1。结果显示共有峰共有 19 个, 其中可指认定性成分有 9 个; 15 批半夏泻心汤物质基准与对照指纹图谱的相似度均 > 0.90, 符合指纹图谱相似度要求。

2.2 对应实物的制备及出膏率测定 分别量取各批次半夏泻心汤物质基准(编号 01 ~ 15) 100 mL, 置于冷冻真空干燥机冻干盘中, 预冻 6 h 后抽真空至恒重, 得冻干粉, 即对应实物 01 ~ 15。按公式出膏率 = $(w \times V) / (v \times M) \times 100\%$ 计算出膏率, 式中 M 为药材质量, V 为半夏泻心汤物质基准体积, v 为取样体积, w 为取样所得对应实物量, 见表 2。

2.3 半夏泻心汤对应实物研究

2.3.1 供试品溶液的制备 取 2.2 项下得到的 15 批半夏泻心汤对应实物, 精密称量 0.15 g 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.3.2 指标成分的含量测定 精密吸取 2.3.1 项下对应实物供试品溶液, 按 2.1.3 项下色谱条件测定, 计算半夏泻心汤对应实物中甘草苷、黄芩苷及汉黄芩苷的含量, 见表 3。

2.3.3 指纹图谱研究 将 2.3.2 项下对应实物色谱信息输入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)进行分析, 见图 2。结果显示共有峰共有 19 个, 其中可指认定性成分有 9 个, 与半夏泻心汤物质基准中可指认定性的成分相同; 15 批半夏泻心汤对应实物与对照指纹图谱的相似度均 > 0.90, 符合指纹图谱相似度要求。

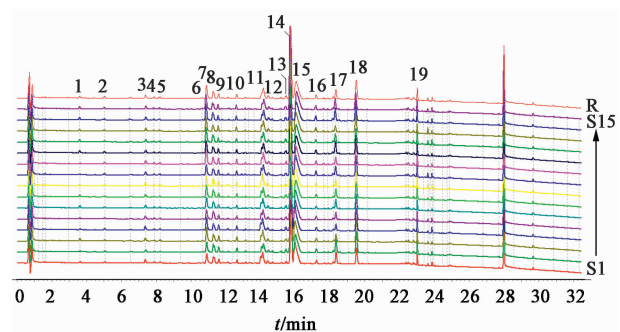
2.4 半夏泻心汤对应实物的 DESI-MSI 研究

2.4.1 对照品样本的制备 取甘草苷等 19 种

表 2 半夏泻心汤物质基准的指标成分含量、出膏率及 pH

Table 2 Index components contents, dry extract rate and pH of substance benchmarks of Banxia Xiexintang

物质基准	甘草苷		黄芩苷		汉黄芩苷		出膏率 /%	pH
	质量 /mg	质量浓度 /g·L ⁻¹	质量 /mg	质量浓度 /g·L ⁻¹	质量 /mg	质量浓度 /g·L ⁻¹		
01	72.50	0.11	632.12	0.93	181.25	0.27	31.81	5.4
02	78.04	0.12	583.97	0.87	194.81	0.29	35.24	5.2
03	65.99	0.11	556.07	0.92	182.39	0.30	36.52	5.1
04	74.35	0.12	459.42	0.72	148.51	0.23	29.31	5.3
05	59.97	0.10	543.77	0.87	180.50	0.29	32.63	5.3
06	92.78	0.15	660.36	1.09	203.44	0.34	35.20	5.4
07	50.17	0.08	714.09	1.12	187.24	0.29	33.86	5.2
08	45.49	0.07	579.60	0.91	161.86	0.25	35.32	5.2
09	52.60	0.09	390.64	0.64	148.39	0.24	32.03	5.2
10	54.26	0.08	417.91	0.62	157.23	0.23	30.57	5.1
11	45.43	0.07	528.90	0.85	190.57	0.31	31.70	5.2
12	53.72	0.10	509.36	0.92	187.54	0.34	32.58	5.4
13	62.00	0.10	566.39	0.94	210.89	0.35	30.13	5.2
14	53.95	0.08	700.00	1.09	215.94	0.33	29.56	5.2
15	48.71	0.07	524.68	0.79	170.71	0.26	33.88	5.3



R. 对照指纹谱; 6. 新甘草苷; 7. 甘草苷; 8. 芹糖苷甘草苷; 11. 表小檗碱; 13. 异甘草苷; 14. 黄芩苷; 15. 小檗碱; 18. 汉黄芩苷; 19. 甘草酸(图 2 同)

图 1 15 批半夏泻心汤物质基准 (S1~S15) 的 UHPLC-DAD 指纹谱
Fig. 1 UHPLC-DAD fingerprints of 15 batches (S1-S15) of Banxia Xiexintang substance benchmark

对照品适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀后使用 5 μL 定量毛细管吸取溶液并点在定性滤纸上, 晾干后, 用打孔器在点样中心位置打孔, 并将打好的圆片附在已贴好双面胶的载玻片上, 见图 3(A)。

2.4.2 对应实物样本的制备 取 2.2 项下 15 批半夏泻心汤对应实物, 精密称量 0.38 g 于 10 mL 量瓶中, 按 2.4.1 项下方法操作, 见图 3(B)。

2.4.3 质谱条件 解吸电喷雾电离离子源

表 3 半夏泻心汤对应实物中指标成分的含量测定

Table 3 Contents of quantitative components in lyophilized powder of Banxia Xiexintang

对应实物	甘草苷		黄芩苷		汉黄芩苷	
	质量 /mg	质量分数 /mg·g ⁻¹	质量 /mg	质量分数 /mg·g ⁻¹	质量 /mg	质量分数 /mg·g ⁻¹
01	78.13	3.32	537.11	22.83	190.71	8.11
02	62.00	2.36	624.02	23.77	208.64	7.95
03	72.77	2.66	472.50	17.28	200.42	7.33
04	85.78	4.01	403.24	18.86	163.54	7.65
05	63.78	2.66	399.88	16.71	175.80	7.34
06	104.94	4.05	604.90	23.36	231.44	8.94
07	86.14	3.51	545.97	22.22	219.65	8.94
08	51.14	1.96	527.06	20.24	180.88	6.95
09	57.51	2.45	338.45	14.44	155.97	6.66
10	62.34	2.74	360.47	15.85	164.58	7.24
11	48.08	2.05	408.28	17.42	183.41	7.83
12	61.27	2.51	455.54	18.70	205.63	8.44
13	66.02	2.97	446.88	20.13	213.92	9.63
14	63.43	2.91	515.37	23.64	224.93	10.32
15	55.97	2.25	453.43	18.22	179.53	7.22

(DESI), 定制毛细管(可加热至 490 °C), 在灵敏度

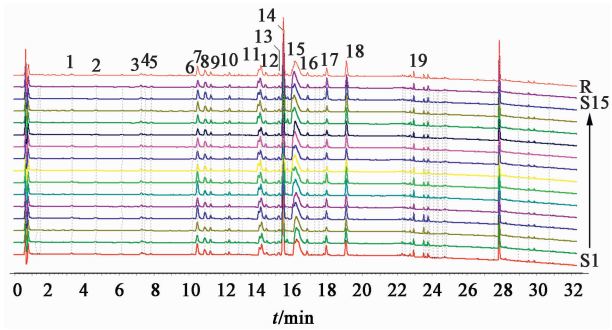


图 2 15 批半夏泻心汤对应实物 (S1 ~ S15) 的 UHPLC-DAD 指纹谱
Fig. 2 UHPLC-DAD fingerprints of 15 batches (S1-S15) of Banxia Xiexintang lyophilized powder

模式下操作,正、负离子全扫描,喷雾电压 3 kV,扫描范围 100 ~ 1 200 Da,空间分辨率 300 μm ,采样锥电压 ± 40 V,喷雾器(氮气)压力 0.5 MPa,溶剂甲醇-甲酸(1 000:1),流量 3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,喷雾器入射角 60 度,收集角 10 度,离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$,数据采集采用 HDImaging 1.4 版软件(美国 Waters 公司)。

2.4.4 指标成分的 DESI-MSI 分析 按照 2.4.3 项下质谱条件分别对对照品和半夏泻心汤对应实物

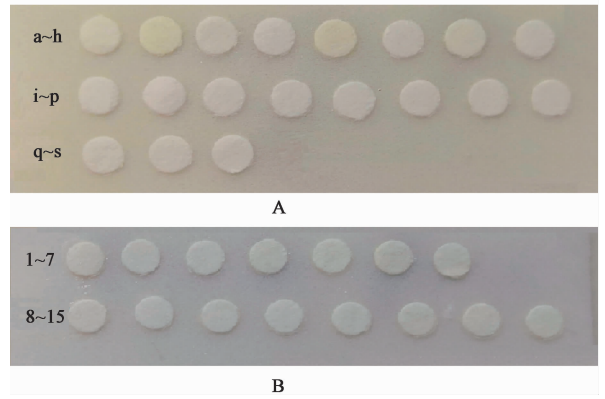


图 3 混合对照品 (A) 及半夏泻心汤对应实物样品 (B) 的样本照片
Fig. 3 Photos of mixed reference substance (A) and Banxia Xiexintang lyophilized powder (B)

进行分析,利用 HDImaging 1.4 软件对采集到的信息进行成像处理与分析,总离子流图见图 4。

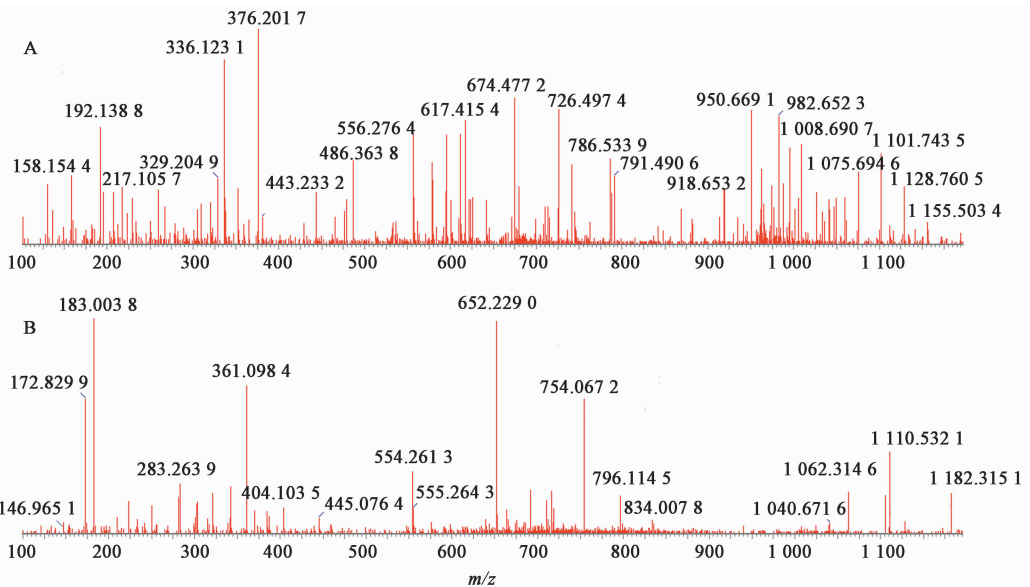


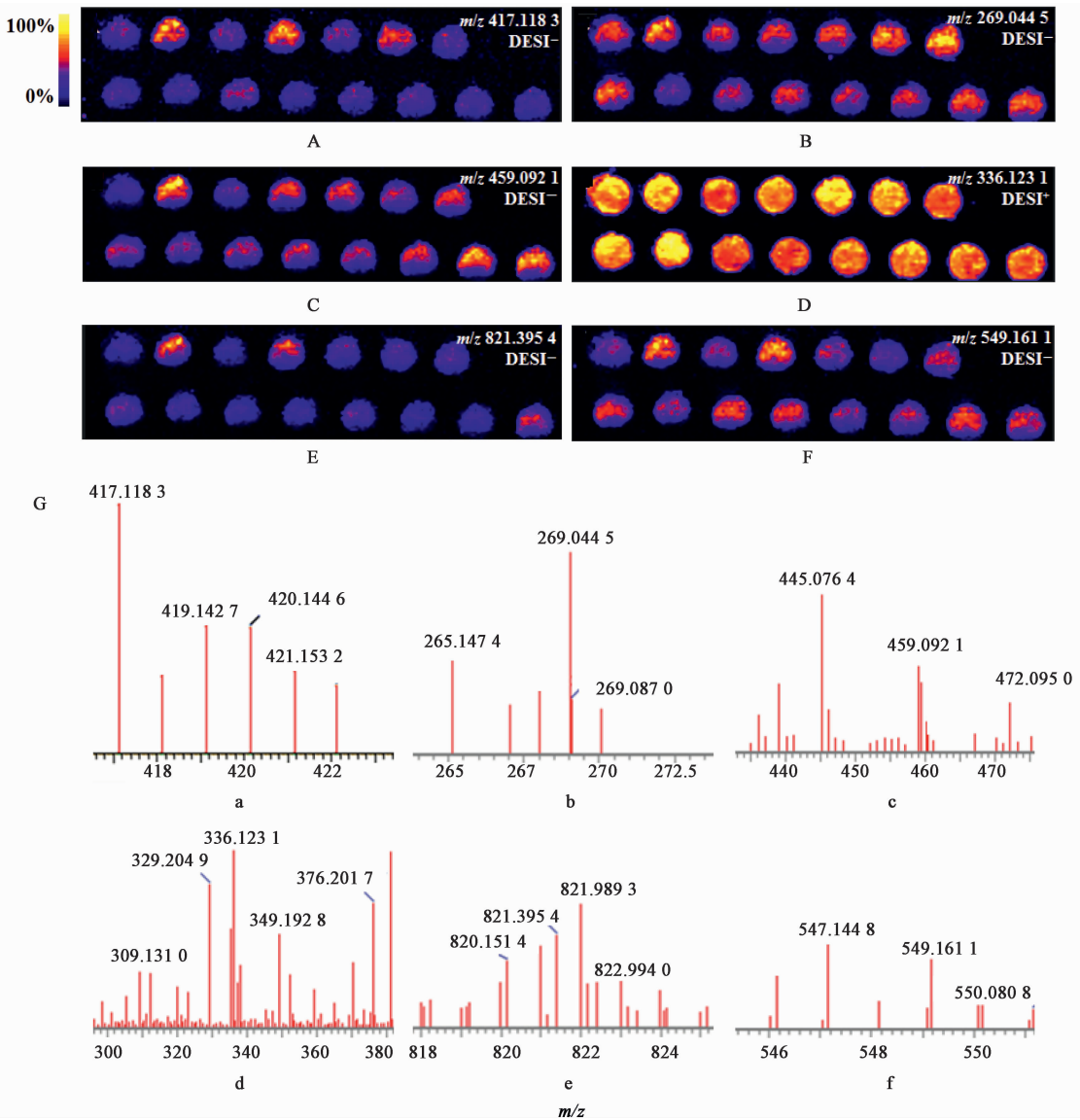
图 4 半夏泻心汤对应实物在不同离子模式下的总离子流
Fig. 4 Total ion current chromatograms of Banxia Xiexintang lyophilized powder under different ion modes

根据对照品样本的 MSI 结果并参考文献 [18-21],可以确定 m/z 417.118 3, 269.044 5, 459.092 1 的分子离子分别源于甘草苷、黄芩苷和汉黄芩苷,见图 5。图 5 (A, B, C) 分别为甘草苷及其同分异构体(新甘草苷、异甘草苷),黄芩苷,汉黄芩苷及其同分异构体千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷在对应实

物样本中的相对质量分数分布;指标成分一级质谱图见图 5 (G)。图 5 (A, B, C) 中各点所示化合物的相对质量分数高低以其峰高值 (HDImaging 1.4 软件以 EXPORT MVA 法计算) 表示,图 5 (A) 峰高值依次为 56.46, 96.06, 58.18, 107.63, 55.80, 80.95, 55.22, 45.17, 40.21, 62.82, 41.23, 45.24, 53.04,

48.34, 41.83; 图 5 (B) 峰高值依次为 177.46, 192.76, 159.04, 162.97, 164.80, 205.78, 232.93, 178.82, 95.53, 142.85, 154.20, 132.92, 147.06, 170.89, 171.79; 图 5 (C) 峰高值依次为 97.75,

231.94, 111.72, 187.89, 172.72, 144.48, 170.18, 137.24, 123.73, 150.36, 149.40, 141.41, 155.80, 204.28, 205.52。其他 DESI-MSI 详细分析结果见表 4。



A. 甘草苷及新甘草苷、异甘草苷; B. 黄芩苷; C. 汉黄芩苷及千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷; D. 小檗碱及表小檗碱; E. 甘草酸; F. 芹糖基甘草苷; G. 各化合物一级质谱 (a~f 分别对应图中化合物 A~F)

图 5 指标成分及共有峰定性成分在半夏泻心汤对应实物中的相对质量分数分布

Fig. 5 Relative content distribution of index components and common peak qualitative components in Banxia Xiexintang lyophilized powder

2.4.5 共有峰 DESI-MSI 分析 根据对照品样本的 MSI 结果并参考文献[18-21], 可确定共有峰中各定性成分的分子离子质荷比, 见图 5。图 5 (D, E, F) 分别为小檗碱及其同分异构体 (表小檗碱) (m/z 336.123 1), 甘草酸 (m/z 821.395 4), 芹糖基甘草苷 (m/z 549.161 1) 在对应实物样本中的相对质量分数分布; 定性成分质谱图见图 5 (G)。其他 DESI-MSI 详细分析结果见表 4。

2.4.6 其他成分 DESI-MSI 分析 除指标成分与共有峰中可定性的成分外, 查阅文献[18-21], 还在物质基准样本的分析结果中发现了多个已知化学成分, 这些成分分别来自甘草、黄连、黄芩、大枣、人参。其在对应实物样本中的相对质量分数分布情况见图 6~9。图 6 (A~E) 化合物来源于自甘草, 图 7 (H~K) 化合物来源于黄连, 图 8 (M~P) 化合物来源于黄芩, 图 9 (S~U) 化合物分别

表 4 半夏泻心汤对应实物样本的 DESI-MSI 分析

Table 4 DESI-MSI analysis of Banxia Xiexintang lyophilized powder

来源	名称	化学式	<i>m/z</i> 理论值	<i>m/z</i> 实测值	误差/ppm	分子离子峰
炙甘草	甘草苷及其同分异构体(新甘草苷、异甘草苷)	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.118 0	417.118 3	0.7	[M - H] ⁻
黄芩	黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	269.044 4	269.044 5	0.4	[M - C ₆ H ₉ O ₆] ⁻
黄芩	汉黄芩苷及其同分异构体(千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷)	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	459.092 1	459.092 1	0	[M - H] ⁻
黄连	小檗碱及其同分异构体(表小檗碱)	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺	336.123 0	336.123 1	0.3	[M] ⁺
炙甘草	甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.395 4	821.395 4	0	[M - H] ⁻
炙甘草	芹糖基甘草苷	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	549.160 2	549.161 1	1.6	[M - H] ⁻
黄连	黄连碱	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄ ⁺	320.091 7	320.091 7	0	[M] ⁺
黄连	非洲防己碱或药根碱	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺	338.138 6	338.136 7	-5.6	[M] ⁺
黄连	-	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.102 3	367.103 5	3.3	[M - H] ⁻
黄连	巴马汀	C ₂₁ H ₂₂ NO ₄ ⁺	352.154 3	352.154 3	0	[M] ⁺
炙甘草	对羟基苯丙酸	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.054 6	165.054 7	0.6	[M - H] ⁻
炙甘草	liquiritigenin-7-O-glucoside-4'-O-gpiosyl-O-glucoside	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₈ Na	711.213 0	711.218 1	7.2	[M - Na - H] ⁻
炙甘草	甘草皂苷 J ₂	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆	823.411 0	823.404 5	-7.9	[M - H] ⁻
炙甘草	甘草皂苷 G ₂	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	837.390 3	837.390 4	0.1	[M - H] ⁻
炙甘草	22β-acetoxy glycyrrhizic acid	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₈	879.400 8	879.401 2	0.5	[M - H] ⁻
黄芩	千层纸素 A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.060 0	283.059 5	-1.8	[M - H] ⁻
黄芩	黄芩素-6-O-葡萄糖醛酸苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445.076 5	445.076 4	-0.2	[M - H] ⁻
黄芩	hydroxyl oroxylin A-7-O-glucuronide or hydroxyl wogonoside	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475.087 1	475.087 3	0.4	[M - H] ⁻
黄芩	白杨素 6-C-阿拉伯糖 8-C-葡萄糖苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	547.144 6	547.144 8	0.4	[M - H] ⁻
大枣	zizyphusin	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ ⁺	342.169 9	342.169 8	-0.3	[M] ⁺
大枣	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.145 0	609.145 2	0.3	[M - H] ⁻
人参	人参皂苷 Rg ₁	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	823.481 4	823.480 7	-0.9	[M + Na] ⁺

来源于大枣、人参;图 6(F),图 7(L),图 8(Q),图 9(V)为各化合物一级质谱图。具体 DESI-MSI 详细分析结果见表 4。

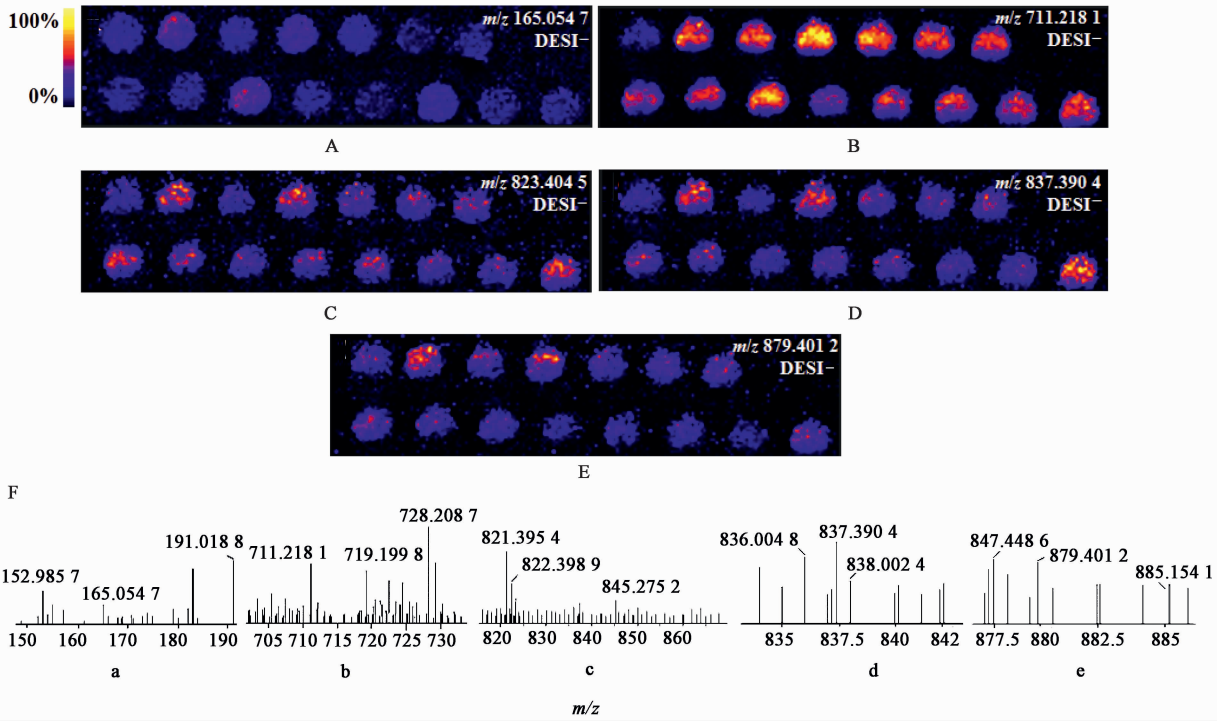
3 结果分析

15 批半夏泻心汤物质基准中指标成分(甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷)质量浓度分别为 0.07 ~ 0.15, 0.62 ~ 1.12, 0.23 ~ 0.35 g · L⁻¹; 对应实物中这 3 个成分的质量分数分别为 1.96 ~ 4.05, 14.44 ~ 23.77, 6.66 ~ 10.32 mg · g⁻¹。部分指标成分含量在不同批次样品中差异较大,除所用不同产地不同批次的饮片质量不同等原因外,在制备过程中,所选取饮片的形状、大小、取材部位等都是造成物质基准及对应实物质量波动的主要原因。浸膏或干膏粉等对应实物的定量检测,可以为后期中间体调配方法的制定提供依据,以保证终产品批间的质量均一性。半夏泻心汤物质基准的出膏率处于 29.31% ~ 36.52%, 平均出膏率 32.69%, 标准偏差

(RE)2.3%。

指纹图谱研究结果表明,按古代制备工艺得到的半夏泻心汤物质基准指纹图谱具有极高的相似性,相似度均 > 0.9, 其中共有峰 19 个, 指认了其中 9 个, 分别为新甘草苷、甘草苷、芹糖基甘草苷、表小檗碱、异甘草苷、黄芩苷、小檗碱、汉黄芩苷、甘草酸。以上结果在对应实物的指纹图谱中均可完整体现, 这表明在“物质基准-对应实物”这一经典名方开发与研制的核心环节中,半夏泻心汤主要成分得到了较为理想的保留。

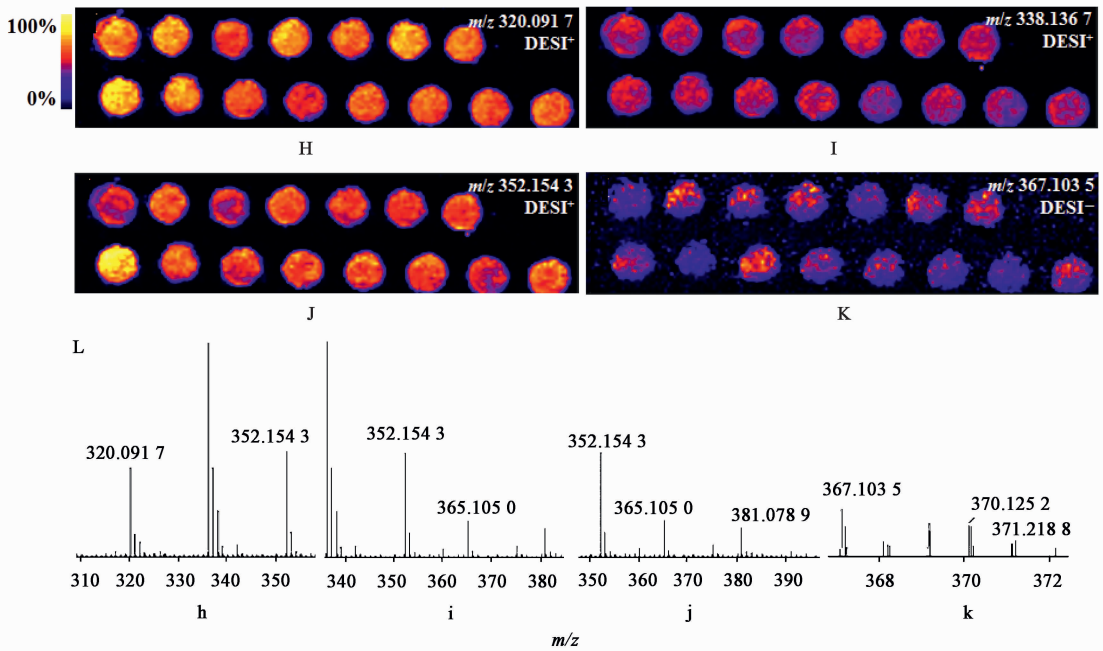
本研究应用 DESI-MSI 技术对半夏泻心汤对应实物中来自黄连、黄芩、人参、炙甘草、大枣的 22 个化学成分进行定性, 分析结果明显优于 UHPLC-DAD。并可通过峰高值的计算半定量分析各成分在不同样品中的相对含量关系。结果发现甘草苷、汉黄芩苷与 UHPLC-DAD 测得的定量结果相关性并不理想, 这与 MSI 不能区分同分异构体有关, 图 5(A,



A. 对羟基苯丙酸; B. liquiritigenin-7-O-glucoside-4'-O-gpiosyl-O-glucoside; C. 甘草皂苷 J₂; D. 甘草皂苷 G₂; E. 22β-acetoxy glycyrrhizic acid; F. 各化合物一级质谱 (a~e 分别对应图中化合物 A~E)

图 6 甘草中其他成分在半夏泻心汤对应实物中的相对质量分数分布

Fig. 6 Relative content distribution of other components from Glycyrrhizae Radix et Rhizoma in Banxia Xiexintang lyophilized powder



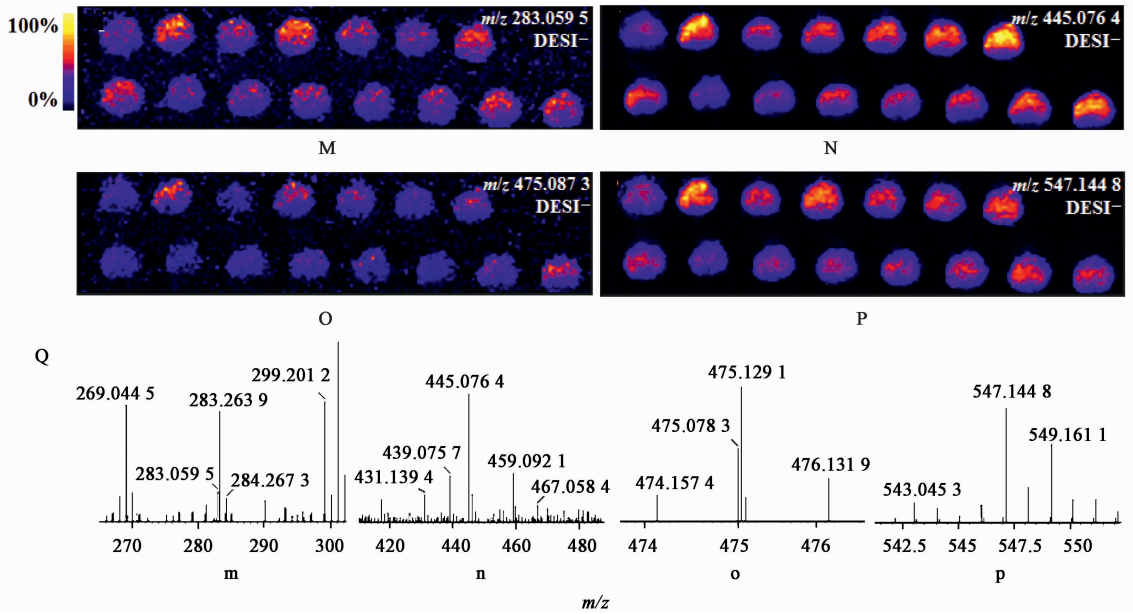
H. 黄连碱; I. 非洲防己碱或药根碱; J. 巴马汀; K. 未知成分; L. 各化合物一级质谱 (h~k 分别对应图中化合物 H~K)

图 7 黄连中其他成分在半夏泻心汤对应实物中的相对质量分数分布

Fig. 7 Relative content distribution of other components from Coptidis Rhizoma in Banxia Xiexintang lyophilized powder

C) 中所表达的分别为甘草苷及其同分异构体 (新甘草苷、异甘草苷等), 汉黄芩苷及其同分异构体 (千

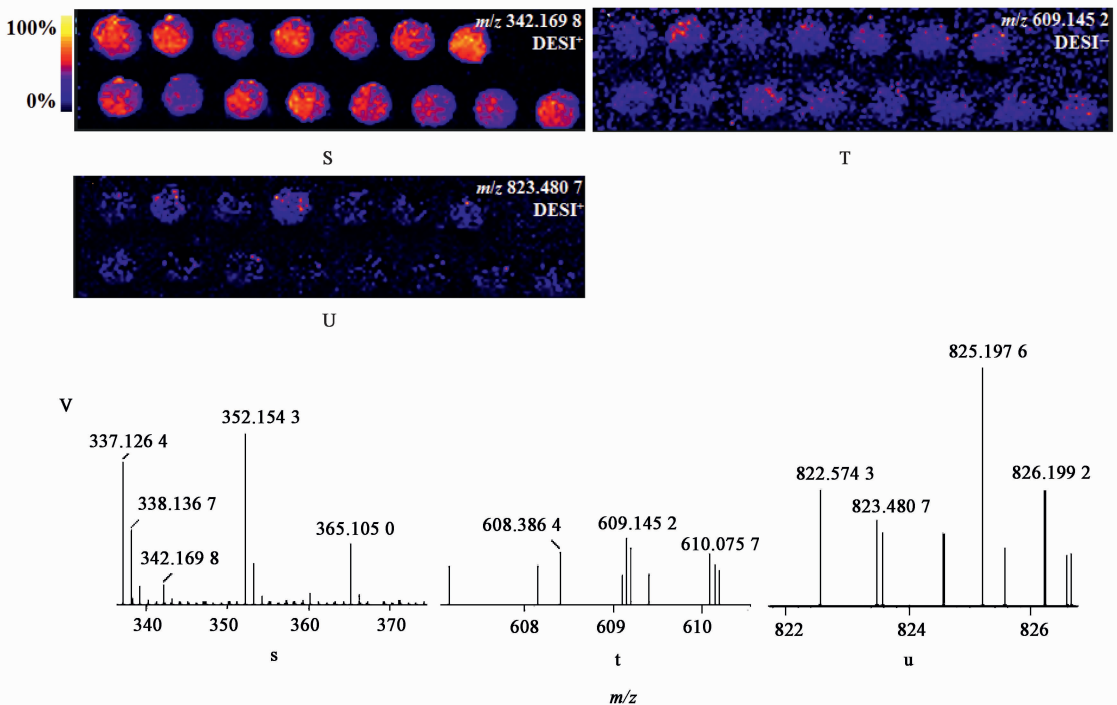
层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷) 在对应实物样本中的相对质量分数分布, 并非仅仅代表指标成分



M. 千层纸素 A; N. 黄芩素-6-*O*-葡萄糖醛酸苷; O. hydroxyl oroxylin A-7-*O*-glucuronide or hydroxyl wogonoside; P. 白杨素 6-*C*-阿拉伯糖 8-*C*-葡萄糖苷; Q. 各化合物一级质谱 (m ~ p 分别对应图中化合物 M ~ P)

图 8 黄芩中其他成分在半夏泻心汤对应实物中的相对质量分数分布

Fig. 8 Relative content distribution of other components from *Scutellariae Radix* in Banxia Xiexintang lyophilized powder



S. zizyphusin; T. 芦丁; U. 人参皂苷 R_{g1}; V. 各化合物一级质谱 (s ~ u 分别对应图中化合物 S ~ U)

图 9 大枣及人参中其他成分在半夏泻心汤对应实物中的相对质量分数分布

Fig. 9 Relative content distribution of other components from *Jujubae Fructus* and *Ginseng Radix et Rhizoma* in Banxia Xiexintang lyophilized powder

甘草苷、汉黄芩苷。而黄芩苷在对应实物样本中的含量远高于甘草苷、汉黄芩苷,在图 5(B)中受同分异构体影响较小,MSI 半定量结果与对应实物中黄

芩苷定量结果相关性较强。

4 讨论

根据半夏泻心汤各配伍药味在 2015 年版《中国

药典》中的含量测定成分, 优选成分质量分数 $\geq 1.0\%$ 且性质稳定、易于检测的化合物作为指标成分。其中半夏虽为半夏泻心汤之君药, 但该饮片在 2015 年版《中国药典》中无含量测定成分, 干姜、黄连虽为臣药, 但干姜的含量测定成分 6-姜辣素在半夏泻心汤物质基准中含量低且不稳定, 黄连中小檗碱的峰型拖尾严重不利于加样回收率的考察, 人参、大枣为佐药, 其含量测定成分对半夏泻心汤指纹图谱共有峰贡献不大, 故以上成分均不适合选为指标成分; 黄芩中黄芩苷、汉黄芩苷在指纹图谱中总峰面积占比较大且分离度良好, 炙甘草对半夏泻心汤指纹图谱共有峰贡献最大, 其中甘草苷较甘草酸在 237 nm 处的出峰时间与峰形更为理想, 所以选择甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷作为定量分析的指标成分, 以便更加全面体现物质在药材-饮片-物质基准-对应实物中的传递规律。

传统 UHPLC 作为高度稳定、可靠、重复性好的分离技术, 广泛应用于中药质量控制研究, 但在配伍药材众多且化学成分复杂的中药复方研究上, 仍存在不可避免的局限性。本研究中 UHPLC 虽针对半夏泻心汤建立了专属性强的指纹图谱, 从整体上探究物质基准-对应实物的物质群量值关系, 可为经典名方的质控研究提供有意义的参考, 但对于已建立的半夏泻心汤物质基准及对应实物指纹图谱, 其定量、定性成分全部源自炙甘草、黄芩、黄连, 其他配伍药材并未体现, 提示仅运用 UHPLC 并不能对半夏泻心汤的质量进行较为全面的成分分析与质量把控。

MSI 技术常用于动植物组织切片的成像研究, 本研究将该技术应用于经典名方质控研究。发现该技术取样量少、预处理简单, 4 h 即可完成 15 批半夏泻心汤对应实物的样品分析(正、负离子模式下), 远远小于 UHPLC-DAD 的分析时间(15 批半夏泻心汤对应实物共分析 10.5 h)。对比分析结果, DESI-MSI 获得数据信息量远大于 UHPLC-DAD, 可以对经典名方中多组复杂、难以定性的成分进行定性及半定量分析, 也可通过复方中单味药的单煎、阴性对照等方法确定各药味在复方中的专属性化学成分, 从而在无对照品的情况下, 快速完成对经典名方等复方制剂的质控。本方法无需考虑流动相选择、浓度梯度设置、色谱柱分离能力、检测器适用性等常规分析手段中常见的问题。

DESI-MSI 虽无法对指标成分做到精确定量, 但仍可通过计算各批次样品中指标成分的峰高值, 半定量分析比较指标成分在不同样品间的含量关系。

值得注意的是, MSI 无法区分同分异构体, 故选择半定量指标成分时应充分考虑其同分异构体对分析结果的影响。即便如此, DESI-MSI 仍提供了大量的结构信息, 后续可通过比较复方在 DESI-MSI 下各单味药单煎-合煎的成分分布关系, 结合药物及其代谢物在给药动物组织切片中的分布, 确定药效成分来源及作用靶点, 为经典名方质量控制体系的搭建筛选更为合理的指标成分, 也为后期药效物质基础研究奠定基础。

研究过程中部分操作仍可改进, 由 MSI 图谱可以看出部分成分在样本圆片上分布不均, 影响了分析结果直观性, 本研究虽已选择用于纸色谱的定性滤纸作为样品支持物, 但仍存在由于纸纤维分布不均导致样品扩散不均匀的现象。同样, 在样本制作过程中人为打孔位置、点样方式的选择等问题, 都会对化学成分在样本上的分布造成影响, 可见研制 DESI-MSI 配套的标准点样仪与点样板是十分必要的。本研究仅对样本进行了一级结构分析, 分析结果受同分异构体影响, 后续将研究二级甚至三级结构的分析是否对分析结果有较大改善。

[致谢] 美国 Waters 公司应用工程师林继红、贾晓飞、贾伟在数据处理环节提供的技术支持!

[参考文献]

- [1] 张嘉鑫, 顾然, 郭宇, 等. 半夏泻心汤之方药考[J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(1): 182-185.
- [2] 王惠英, 曹圣荣. 半夏泻心汤方证探微[J]. 实用中医内科杂志, 2017, 31(9): 76-79.
- [3] 童荣生, 李晋奇, 彭成, 等. 半夏泻心汤及其苦降药组 HPLC 指纹图谱的比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(7): 1578-1581.
- [4] 王瑞, 王志刚. 半夏泻心汤治疗痞证验案举隅[J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(16): 74-75.
- [5] 邓哲, 刘德文, 杜杰, 等. 经典名方研发建议的梳理和探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17): 181-186.
- [6] 唐晓章, 林美斯, 周菲, 等. 经典名方芍药甘草汤的物质基准量值传递分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(14): 62-69.
- [7] 冯红, 潘桂湘. 高分辨质谱在中药化学成分分析中的应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(8): 40-42.
- [8] 刘念, 刘锋, 许彬, 等. 生物组织质谱成像方法的建立及其在微波辐射后大鼠海马组织的蛋白组分析中的应用[J]. 分析化学, 2008, 36(4): 421-425.
- [9] WU C P, IFA D R, MANICKE N E, et al. Rapid, direct analysis of cholesterol by charge labeling in reactive

- desorption electrospray ionization [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(18):7618-7624.
- [10] DILL A L, EBERLIN L S, ZHENG C, et al. Multivariate statistical differentiation of renal cell carcinomas based on lipidomic analysis by ambient ionization imaging mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398(7/8):2969-2978.
- [11] 邓远雄, 李晓宇. 体内药物分析 [M]. 长沙: 中南大学出版社, 2016: 188-192.
- [12] TILLNER J, WU V, JONES E A, et al. Faster, more reproducible DESI-MS for biological tissue imaging [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017, 28(10):2090-2098.
- [13] TAKÁTS Z, WISEMAN J M, COOKS R G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology [J]. *J Mass Spectrom*, 2005, 40(10):1261-1275.
- [14] ABBASSI-GHADI N, JONES E A, VESELKOV K A, et al. Repeatability and reproducibility of desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI-MS) for the imaging analysis of human cancer tissue: a gateway for clinical applications [J]. *Anal Methods*, 2015, 7(1):71-80.
- [15] MIAO Z, CHEN H. Direct analysis of liquid samples by desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI-MS) [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20(1):10-19.
- [16] 王中华, 何秉淑, 孙成龙, 等. 基于空气动力辅助离子化-超高分辨质谱成像技术的大鼠肾脏组织中多种类代谢物的分布研究 [J]. *分析化学*, 2018, 46(3):406-412.
- [17] 李冀. 方剂学 [M]. 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 63-65.
- [18] 闫利利, 史家文, 王金芳, 等. 基于 UPLC/Q-TOF-MS^E 方法分析半夏泻心汤的化学成分 [J]. *药学学报*, 2013, 48(4):526-531.
- [19] 惠永正. 中药天然产物大全 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2011: 1818, 3204, 7783.
- [20] YE M, LIU S H, JIANG Z L, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of PHY906, a Chinese medicine formulation for cancer therapy [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(22):3593-3607.
- [21] 吴茵, 白万军, 魏欣. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析木蝴蝶中化学成分 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(2):196-200.

[责任编辑 刘德文]