

## 保元汤物质基准UPLC-PDA指纹图谱的建立及化学成分指认

成焕波<sup>1</sup>, 胡辉<sup>1\*</sup>, 李清安<sup>1</sup>, 刘鹏<sup>1</sup>, 徐江<sup>2</sup>, 朱广伟<sup>2</sup>, 常阿倩<sup>2,3</sup>

(1. 劲牌持正堂药业有限公司, 湖北省中药配方颗粒工程技术研究中心,

中药保健食品质量与安全湖北省重点实验室, 湖北黄石 435100;

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 3. 北京中医药大学, 北京 100102)

**[摘要]** 目的:建立保元汤物质基准的指纹图谱并对其共有峰进行成分指认。方法:制备15批保元汤物质基准,采用超高效液相色谱-二极管阵列检测器法(UPLC-PDA)测定15批保元汤物质基准的指纹图谱,并开展方法学研究;使用ACQUITY UPLC BEH Shield C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相0.05%甲酸水溶液(A)-0.05%甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~0.5 min, 5%~19%B; 0.5~6 min, 19%B; 6~10 min, 19%~27%B; 10~20 min, 27%~45%B; 20~20.1 min, 45%~95%B; 20.1~23 min, 95%B),流速0.4 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长203 nm和260 nm,柱温30 °C,进样量2 μL;采用“中药指纹图谱相似度评价系统”(2012版)建立指纹图谱,并生成对照指纹图谱;采用超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法(UPLC-ESI-MS/MS)和对照品比对等方式进行保元汤物质基准的成分指认,质谱条件为全信息串联质谱(MS<sup>E</sup>)扫描模式检测,质量扫描范围 $m/z$  50~1 200。结果:15批保元汤物质基准与对照指纹图谱的相似度均>0.90,共有37个共有峰,通过UPLC-ESI-MS/MS指认了其中22个,分别为甘草苷,人参皂苷R<sub>g1</sub>,人参皂苷R<sub>b1</sub>,人参皂苷R<sub>e</sub>等,均来源于人参、黄芪、甘草、生姜4味药材。结论:该方法精密度、重复性、稳定性良好,表征了保元汤组分整体特征,为该经典名方的颗粒剂开发提供了实验依据。

**[关键词]** 保元汤;超高效液相色谱法(UPLC);指纹图谱;质谱法(MS);人参皂苷类;经典名方;物质基准

**[中图分类号]** R22;R914;R28;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)07-0016-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202346

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200903.1612.008.html>

**[网络出版日期]** 2020-9-4 9:33

### Establishment of UPLC-PDA Fingerprint of Baoyuantang Substance Benchmark and Identification of Its Chemical Constituents

CHENG Huan-bo<sup>1</sup>, HU Hui<sup>1\*</sup>, LI Qing-an<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>1</sup>, XU Jiang<sup>2</sup>, ZHU Guang-wei<sup>2</sup>, CHANG A-qian<sup>2,3</sup>

(1. Jing Brand Chizhengtang Pharmaceutical Co. Ltd., Hubei Provincial Engineering Technology Research

Center of Traditional Chinese Medicine (TCM) Formula Granule,

Hubei Provincial Key Laboratory for Quality and Safety of TCM Health Food, Huangshi 435100, China;

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

Beijing 100700, China; 3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the fingerprint of Baoyuantang substance benchmark, and to analyze and identify the common peaks. **Method:** A total of 15 batches of Baoyuantang substance benchmark were prepared, ultra performance liquid chromatography-diode array detector method (UPLC-PDA) was used to establish the fingerprint of the substance benchmark, and the methodology was developed. The chromatographic conditions were as follows: ACQUITY UPLC BEH Shield C<sub>18</sub> column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), mobile phase of 0.05% formic acid solution (A) and 0.05% formic acid acetonitrile solution (B) for gradient elution (0-

**[收稿日期]** 20200630(004)

**[基金项目]** 湖北省揭榜制科技项目(2019AEE001)

**[第一作者]** 成焕波,博士,高级工程师,从事中药经典名方、配方颗粒研究,E-mail:121881467@qq.com

**[通信作者]** \*胡辉,工程师,从事中药经典名方、配方颗粒研究,E-mail:95252631@qq.com

0.5 min, 5%-19%B; 0.5-6 min, 19%B; 6-10 min, 19%-27%B; 10-20 min, 27%-45%B; 20-20.1 min, 45%-95%B; 20.1-23 min, 95%B), the flow rate of  $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , the column temperature of  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , the detection wavelength at 203 nm and 260 nm, and the injection volume of  $2 \mu\text{L}$ . Similarity evaluation system of traditional Chinese medicine fingerprint (2012 edition) was used to establish the fingerprint and generate the control fingerprint. The chemical constituents of Baoyuantang substance benchmark were identified by comparison of standard substances and UPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS) with full information tandem mass spectrometry ( $\text{MS}^E$ ) and scanning range of  $m/z$  50-1 200. **Result:** The similarities of 15 batches of Baoyuantang substance benchmark were above 0.90 by comparing with the control fingerprint. There were 37 common peaks, 22 of which were identified through UPLC-ESI-MS/MS, including liquiritin, violanthin, ginsenoside  $\text{Rg}_1$ , ginsenoside  $\text{Rb}_1$ , ginsenoside  $\text{Re}$  and so on. These components were all from *Astragali Radix*, *Ginseng Radix et Rhizoma*, *Zingiberis Rhizoma Recens* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*. **Conclusion:** This method is accurate, stable and reliable, which will basically reflect the overall chemical composition characteristics of Baoyuantang, and it provides experimental basis for development of the granules of this famous classical formulas.

**[Key words]** Baoyuantang; ultra performance liquid chromatography (UPLC); fingerprint; mass spectrometry (MS); ginsenosides; famous classical formulas; substance benchmark

保元汤是《古代经典名方目录(第一批)》<sup>[1]</sup>收录的第71个处方,出自孙志宏所著《简明医彙》<sup>[2]</sup>,由人参一钱、黄芪二钱、甘草五分、肉桂二分、生姜一片组成,用于治疗元气虚弱,精神倦怠,肌肉柔慢,饮食少进,面青眇白,睡卧宁静,痘顶不起,浆不足及有杂证等。现代药理研究表明,保元汤具有调节免疫、促进造血、调节凝血及纤溶平衡、抗氧化、抗应激等作用<sup>[3-4]</sup>,在临床上常用于心衰、冠心病、缓慢性心律失常等心血管疾病的治疗<sup>[5]</sup>。其作用机制为多靶点协同作用,包括调控蛋白激酶和生长因子的表达,调控线粒体功能、氧化应激通路、钙离子通路等<sup>[6-8]</sup>,这些药理作用均可能与其补气功效相关。

保元汤的现代研究目前仅涉及到药理研究和临床应用方面,化学成分研究很少,对其指纹图谱研究至今未见报道。基于此,本实验应用现代工艺进行保元汤物质基准的制备,通过色谱技术和质谱技术对各成分进行分离鉴定研究。利用 UPLC-PDA 技术建立了保元汤物质基准的指纹图谱,并通过 UPLC-ESI-MS/MS 进一步对共有峰进行研究,指认了22个共有峰,可为保元汤质量标准的制定及成药的开发奠定基础。

## 1 材料

ACQUITY UPLC H-Class 型超高效液相色谱仪和 Vion IMS Q TOF 型离子淌度分析高分辨质谱仪(美国 Waters 公司), Quintix 125D-1 CN 型 1/1 万电子分析天平(德国赛多利斯公司)。甘草酸铵,人参

皂苷  $\text{Rg}_1$ ,  $\text{Rb}_1$ ,  $\text{Re}$  对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110731-201212, 110703-201601, 110704-201611, 110754-201609, 纯度分别为 96.2%, 92.4%, 91.2%, 92.3%); 甘草苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(成都德斯特生物技术有限公司,批号分别为 DST 180411-109, DST 171121-009, 纯度分别为 95.3%, 97.2%), 水为娃哈哈纯净水, 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为色谱纯。

保元汤处方药材均采自道地产区,采集批次均超过25批,经中国中医科学院中药研究所陈士林研究员鉴定,人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根和根茎,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根和根茎,肉桂为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* 的干燥树皮,生姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的新鲜根茎,按照2015年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)要求炮制加工,制成饮片,经鉴甄检测技术(上海)有限公司按2015年版《中国药典》要求全检,各挑选15批合格饮片,各药材产地与批号信息详见表1。将各批饮片随机组合,根据《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求(征求意见稿)》<sup>[9]</sup>要求,制备15批保元汤物质基准样品,批号BYT01~BYT15,不同批次保元汤物质基准样品批号 and 对应饮片批号信息见表2。

表1 保元汤物质基制备用药材的来源和批号信息

Table 1 Source and batch number information of medicinal materials for preparation of Baoyuantang substance benchmark

药材	产地	批号
人参	辽宁省桓仁县	RSYCHR01, RSYCHR02, RSYCHR03, RSYCHR04, RSYCHR05
	吉林省长白县	RSYCCB11, RSYCCB12, RSYCCB13, RSYCCB14, RSYCCB15
	吉林省抚松县	RSYCFS16, RSYCFS17, RSYCFS18, RSYCFS19, RSYCFS20
黄芪	甘肃省岷县	HQYCMX01, HQYCMX02, HQYCMX03, HQYCMX04, HQYCMX05, HQYCMX06, HQYCMX12, HQYCMX13, HQYCMX14, HQYCMX15, HQYCMX16
	甘肃省漳县	HQYCZX17
	甘肃省渭源县	HQYCWX25
	内蒙古包头市	HQYCDMQ28, HQYCDMQ29
甘草	甘肃省榆中县	GCYCYZ01, GCYCYZ04, GCYCYZ05, GCYCYZ06
	甘肃省民勤县	GCYCMQ09, GCYCMQ11
	内蒙古杭锦旗	GCYCHJQ15, GCYCHJQ18, GCYCHJQ21, GCYCHJQ23, GCYCHJQ25
	新疆巴音郭楞	GCYCBYGL26
	甘肃省白银市景泰县	GCYCJT31, GCYCJT36, GCYCJT37
肉桂	广西省防城港市	RGYCFCG02, RGYCFCG03, RGYCFCG04, RGYCFCG05, RGYCFCG06, RGYCFCG08, RGYCFCG09, RGYCFCG13, RGYCFCG15, RGYCFCG16, RGYCFCG17
	广东省郁南县	RGYCYF21
	广东省德庆市	RGYCDQ23, RGYCDQ24
	广东省罗定市	RGYCLD26
生姜	四川省犍为县	SJYCJW04, SJYCJW26
	山东省济宁市泗水县	SJYCJN07, SJYCJN08
	云南省曲靖市罗平县	SJYCLP11, SJYCLP12, SJYCLP13
	云南省文山市	SJYCWS15, SJYCWS16, SJYCWS17
	四川省沐川县	SJYCMC27, SJYCMC28, SJYCMC29, SJYCMC30, SJYCMC31

表2 保元汤物质基制备用饮片的随机组合

Table 2 Random combination of decoction pieces for preparation of Baoyuantang substance benchmark

批号	人参	黄芪	甘草	肉桂	生姜
BYT01	RSYCCB12	HQYCMX14	GCYCHJQ23	RGYCFCG15	SJYCLP11
BYT02	RSYCHR03	HQYCMX02	GCYCHJQ18	RGYCFCG02	SJYCJN07
BYT03	RSYCCB11	HQYCMX01	GCYCHJQ21	RGYCYF21	SJYCMC30
BYT04	RSYCHR02	HQYCDMQ29	GCYCJT31	RGYCFCG17	SJYCMC28
BYT05	RSYCHR01	HQYCDMQ28	GCYCYZ06	RGYCLD26	SJYCWS15
BYT06	RSYCHR05	HQYCMX12	GCYCJT37	RGYCFCG09	SJYCJW26
BYT07	RSYCHR04	HQYCMX05	GCYCMQ09	RGYCFCG03	SJYCMC31
BYT08	RSYCFS16	HQYCMX03	GCYCMQ11	RGYCFCG08	SJYCLP13
BYT09	RSYCCB14	HQYCMX13	GCYCJT36	RGYCFCG13	SJYCWS16
BYT10	RSYCCB13	HQYCWX25	GCYCBYGL26	RGYCDQ23	SJYCJW04
BYT11	RSYCFS17	HQYCMX15	GCYCYZ01	RGYCFCG05	SJYCWS17
BYT12	RSYCFS18	HQYCMX04	GCYCYZ04	RGYCFCG16	SJYCLP12
BYT13	RSYCFS19	HQYCMX16	GCYCHJQ25	RGYCFCG04	SJYCJN08
BYT14	RSYCCB15	HQYCZX17	GCYCHJQ15	RGYCFCG06	SJYCMC29
BYT15	RSYCFS20	HQYCMX06	GCYCYZ05	RGYCDQ24	SJYCMC27

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, ACQUITY UPLC BEH Shield C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 203 nm 和 260 nm, 柱温 30 °C, 进样量 2 μL, 流动相 0.05% 甲酸水溶液(A)-0.05% 甲酸乙腈溶液(B) 梯度洗脱(0~0.5 min, 5%~19%B; 0.5~6 min, 19%B; 6~10 min, 19%~27%B; 10~20 min, 27%~45%B; 20~20.1 min, 45%~95%B; 20.1~23 min, 95%B)。理论板数按甘草酸计不低于 6 000。

**2.2 混合对照品溶液的制备** 分别取人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, Rg<sub>1</sub>, Re, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷, 甘草苷和甘草酸铵对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 分别含 200.64, 210.37, 128.68, 55.40, 21.29, 156.41 μg 的混合对照品溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 保元汤物质基准的制备方法参照《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求(征求意见稿)》, 根据明代一钱=3.73 g 和一分=0.373 g 折算, 确定处方为人参 3.73 g, 黄芪 7.46 g, 甘草 1.86 g, 肉桂 0.75 g, 生姜 1 片按 3 g 折算。分别按表 2 中组合称取 4 倍处方量饮片, 放入煎药壶中, 浸泡 30 min, 一煎加水 800 mL, 煎煮 60 min, 二煎加水 760 mL, 煎煮 40 min, 减压浓缩后进行冷冻干燥, 即得保元汤物质基准冻干粉, 批号分别记为 BYT01~BYT15。分别取 BYT01~BYT15 冻干粉约 0.2 g, 精密称定, 置 15 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 加 50% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

### 2.4 耐用性考察

**2.4.1 流动相类型** 分别考察了甲醇-水、甲醇-甲酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液、甲酸乙腈混合液-甲酸水溶液等洗脱系统, 结果表明甲酸乙腈混合液-甲酸水溶液系统的分离效果较好, 进一步考察了甲酸乙腈混合液-甲酸水系统中甲酸的比例, 最终确定以 0.05% 甲酸水溶液为流动相 A, 0.05% 甲酸乙腈溶液为流动相 B 进行梯度洗脱的效果较好。

**2.4.2 供试品溶液制备方法** 分别考察了水, 50% 甲醇和甲醇 3 种溶剂超声提取对冻干粉溶解效果及图谱效果的区别, 结果表明冻干粉在 50% 甲醇中溶解效果最好, 且图谱中各特征峰分离度效果最佳。

**2.4.3 色谱柱** 分别考察了 3 种不同型号 C<sub>18</sub> 色谱柱(ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>, CORTECS UPLC C<sub>18</sub>, ACQUITY UPLC BEH Shield C<sub>18</sub>) 对样品的分

离效果, 结果表明 3 种色谱柱对样品均具有较好分离效果, 但 ACQUITY UPLC BEH Shield C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 对人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 及 Re 能够起到更加明显的分离效果。

**2.4.4 柱温** 分别在 20, 30, 40 °C 不同柱温条件下考察柱温对分离条件的影响, 结果表明不同柱温条件下色谱图整体变化较小, 说明柱温影响不显著, 拟采用柱温 30 °C。

### 2.5 方法学考察

**2.5.1 精密度试验** 取批号 BYT01 的保元汤物质基准, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 结果显示各共有峰在 2 个波长条件下保留时间的 RSD 均≤1.0%, 峰面积的 RSD 均≤2.0%, 表明仪器精密度良好。

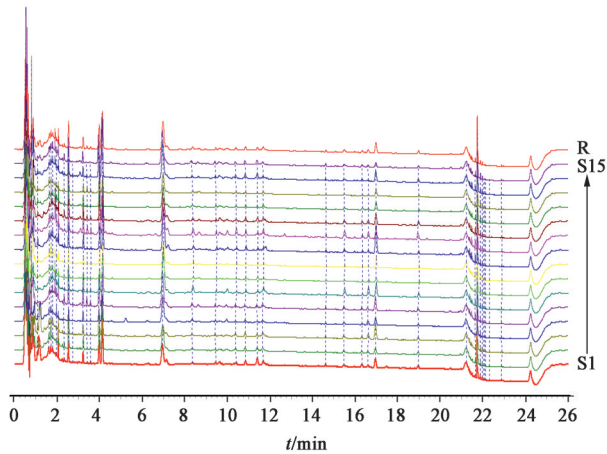
**2.5.2 重复性试验** 取批号 BYT01 的保元汤物质基准 6 份, 按照 2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 结果显示各共有峰在 2 个波长条件下保留时间的 RSD 均≤1.0%, 峰面积的 RSD 均≤5.0%, 说明该方法重复性良好。

**2.5.3 稳定性试验** 取同一批次保元汤物质基准, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别于配制后 0, 2, 8, 10, 16, 24 h 按 2.1 项下色谱条件测定, 结果显示各共有峰在 2 个波长条件下保留时间的 RSD 均≤1.0%, 峰面积的 RSD 均≤3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

### 2.6 指纹图谱的建立

**2.6.1 共有峰的标识** 按 2.3 项下方法制备 15 批保元汤物质基准供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 以峰面积占总峰面积 0.1% 进行积分, 分别将 203 nm 和 260 nm 处得到的色谱图导入“中药指纹图谱相似度评价系统”(2012 版), 采用中位数法进行指纹图谱分析, 得 15 批保元汤物质基准的指纹图谱, 见图 1, 2; 同时, 生成对照指纹图谱, 见图 3, 4。

**2.6.2 相似度评价** 采用“中药指纹图谱相似度评价系统”(2012 版) 软件分别对保元汤物质基准在 203 nm 和 260 nm 处的 UPLC 图谱进行相似度分析, 结果显示 15 批物质基准与对照指纹图谱的相似度均>0.90, 样品 BYD01~BYT15 在 203 nm 处的相似度分别为 0.955, 0.970, 0.986, 0.963, 0.926, 0.963, 0.960, 0.968, 0.951, 0.949, 0.972, 0.979, 0.954, 0.983, 0.961; 在 260 nm 处的相似度分别为 0.979, 0.996, 0.963, 0.969, 0.974, 0.967, 0.978, 0.994, 0.962, 0.964, 0.989, 0.988, 0.977, 0.975, 0.976。



R. 对照指纹图谱; S1~S15. BYT01~BYT15 (图2同)

图1 15批保元汤物质基准在203 nm处的UPLC指纹谱

Fig. 1 UPLC fingerprint of 15 batches of Baoyuantang substance benchmark at 203 nm

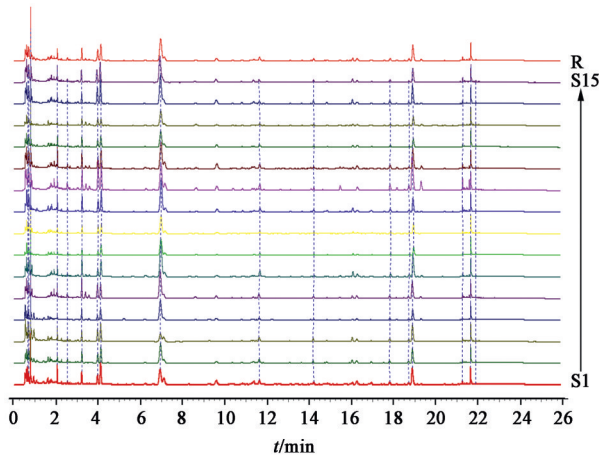
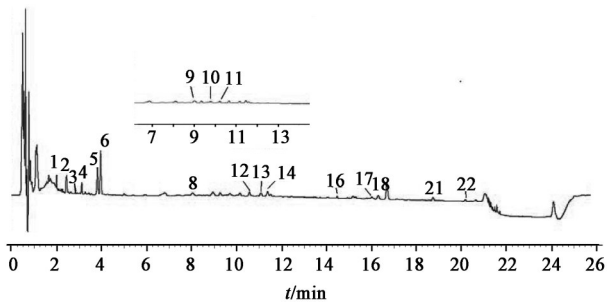


图2 15批保元汤物质基准在260 nm处的UPLC指纹谱

Fig. 2 UPLC fingerprint of 15 batches of Baoyuantang substance benchmark at 260 nm



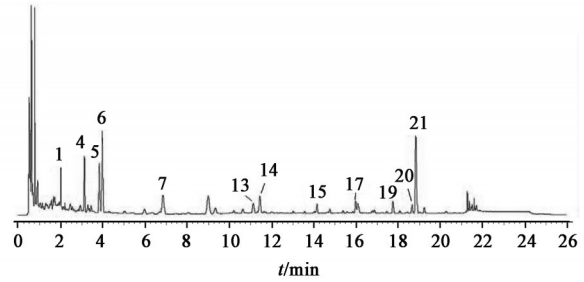
9. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 10. 人参皂苷 Re; 16. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub>

图3 保元汤物质基准在203 nm处的对照指纹谱

Fig. 3 Reference fingerprint of Baoyuantang substance benchmark at 203 nm

## 2.7 共有峰的UPLC-ESI-MS/MS分析

**2.7.1 质谱条件** 色谱条件(进样量除外)和对照品溶液、供试品溶液制备方法同2.1~2.3。质谱条件为sensitivity模式,低能通道碰撞电压4 eV,高能通



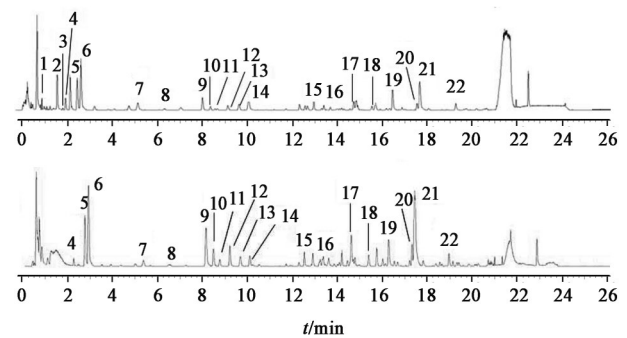
4. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 6. 甘草苷; 21. 甘草酸(S)

图4 保元汤物质基准在260 nm处的对照指纹谱

Fig. 4 Reference fingerprint of Baoyuantang substance benchmark at 260 nm

道碰撞电压25~45 eV,采用全信息串联质谱(MS<sup>E</sup>)模式检测,扫描范围 $m/z$  50~1 200,进样量5  $\mu$ L。

**2.7.2 质谱分析** 总离子流色谱图见图5,采用数据库对比并结合相关文献分析进行成分指认,结果指认了22个成分,均来源于人参、黄芪、甘草、生姜4味药材。



A. 正离子模式; B. 负离子模式

图5 保元汤物质基准的UPLC-ESI-MS/MS总离子流

Fig. 5 Total ion chromatograms of Baoyuantang substance benchmark by UPLC-ESI-MS/MS

以峰6, 5, 16为例进行裂解途径解析,6号峰的相对分子质量418,与甘草苷相同,查阅文献[10]可知甘草苷裂解规律为先苷元断裂成 $m/z$  255碎片,并进一步根据二氢黄酮类化合物裂解规律裂解成 $m/z$  135碎片,6号峰裂解碎片峰符合甘草苷裂解规律,且6号峰和甘草苷对照品保留时间一致,故确定其为甘草苷。5号峰的 $[M+Na]^+$ ,  $[M-H]^-$ 分别为573, 549, 分子离子峰较6号峰多 $m/z$  132,且碎片中 $m/z$  417可能为6号峰 $[M-H]^-$ 碎片离子;5号峰相对分子质量550与芹糖甘草苷相同,结合文献[11-12]报道,确定5号峰为芹糖甘草苷。16号峰相对分子质量1 109,与人参皂苷Rb<sub>1</sub>相同,根据文献[13-14]可知,人参皂苷Rb<sub>1</sub>在正离子模式易形成 $[M+Na]^+$ 离子峰,负离子模式易形成 $[M+HCOO]^-$ 离子峰,这与16号峰中 $m/z$  1 131和 $m/z$  1 153的碎片离子峰吻合,

人参皂苷 Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub> 等均为达玛烷型三萜类物质, 负离子模式下均会在丢失糖基基团而生成  $m/z$  459 的特征碎片, 另外, 其负离子模式还易失去一系列  $m/z$  162 的葡萄糖碎片, 得到  $m/z$  为  $[M-162-H]^-$ ,

$[M-162-162-H]^-$ ,  $[M-162-162-162-H]^-$  的碎片离子, 这些碎片离子均与 16 号峰负离子模式中  $m/z$  945, 783, 621 碎片离子质荷比相同, 故确定 16 号峰为人参皂苷 Rb<sub>1</sub>。同理可鉴别出其他成分, 见表 3。

表 3 保元汤物质基准指纹图谱共有峰的 UPLC-ESI-MS/MS 鉴定

Table 3 Identification and analysis of common peaks in fingerprint of Baoyuantang substance benchmark by UPLC-ESI-MS/MS

共有峰	$t_R$ /min	分子式	相对分子质量	$[M+H]^+/[M+Na]^+$		$[M-H]^-/[M+HCOO]^-$		化合物	来源
				母离子	碎片离子	母离子	碎片离子		
1	2.027	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	580.179 21	603.168 1	603.167 7, 419.136 2, 257.081 2, 137.023 7	579.172 5	625.177 9, 579.172 8, 417.119 1	甘草苷元-7,4'-二葡萄糖苷 <sup>[15]</sup>	甘草
2	2.642	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	550.122 35	551.176 0	551.176 0, 257.081 2, 137.023 7	595.124 6	595.124 6, 549.117 8, 175.126 2	4'-O-(1→2)-葡萄糖甘草苷 <sup>[16]</sup>	甘草
3	2.929	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	578.163 56	579.171 1	579.170 7, 379.081 2, 365.101 9	577.156 5	577.156 7, 413.088 0, 395.077 2	佛菜心苷 <sup>[17]</sup>	甘草
4	3.143	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	446.121 30	447.129 8	447.129 3, 285.076 3, 270.052 5	491.120 0	491.120 0, 445.167 4, 283.060 8, 268.037 2	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 <sup>[16,18]</sup>	黄芪, 甘草
5	3.848	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	550.168 64	573.157 5	573.157 5, 551.176 0, 419.134 3, 257.081 1, 137.023 8	549.161 3	549.161 7, 417.119 1, 255.066 1, 135.008 5	芹糖甘草苷 <sup>[11-12]</sup>	甘草
6	3.989	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	418.126 38	419.134 8	441.116 0, 419.134 3, 257.081 1, 137.023 7	417.118 8	417.118 9, 255.065 9, 135.008 5	甘草苷 <sup>[10,15]</sup>	甘草
7	6.865	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	430.126 38	431.134 1	453.116 4, 431.134 1, 269.081 0, 254.056 9	475.125 1	475.124 5, 267.065 7, 252.042 1	7-甲氧基甘草苷 <sup>[19]</sup>	甘草
8	8.101	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	462.152 60	463.163 0	485.141 8, 463.163 0, 301.106 8, 167.070 5	507.151 1	507.150 8, 461.114 9, 299.092 1	9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷 <sup>[20]</sup>	黄芪
9	9.332	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub>	800.492 21	823.478 6	823.478 6, 423.362 4, 405.352 1	845.488 8	845.488 8, 799.483 9, 637.431 4, 475.379 2	人参皂苷 Rg <sub>1</sub> <sup>[21]</sup>	人参
10	9.770	C <sub>48</sub> H <sub>82</sub> O <sub>18</sub>	947.211 14	970.196 0	970.196 0, 790.134 2, 424.023 4, 406.013 4	992.208 2	992.208 2, 946.202 7, 800.144 9, 638.092 3, 476.035 8	人参皂苷 Re <sup>[22]</sup>	人参
11	10.211	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	550.168 64	551.175 7	573.157 1, 551.175 7, 419.133 9, 257.080 7, 137.023 4	549.161 0	595.166 8, 549.160 6, 417.117 2, 255.065 5, 135.008 2	芹糖异甘草苷 <sup>[16]</sup>	甘草
12	10.645	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	418.126 38	419.134 2	419.133 7, 257.080 8, 147.053 5, 137.023 6, 91.059 5	417.118 8	417.118 4, 255.065 4, 135.008 2, 148.016 1, 119.049 8	异甘草苷 <sup>[15]</sup>	甘草
13	11.150	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	256.073 56	257.081 1	257.081 1, 137.023 5	255.065 7	255.065 4, 135.008 1, 119.049 8	甘草素 <sup>[16,23]</sup>	甘草, 黄芪
14	11.454	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	284.068 47	285.075 9	285.076 0, 270.052 0, 253.049 5, 216.068 4	283.060 5	283.060 5, 268.036 7	鹰嘴豆芽素 A <sup>[24]</sup>	黄芪
15	14.160	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>21</sub>	985.052 61	986.055 1	1 008.071 1, 986.055 1, 810.024 3, 647.971 0, 615.983 4, 453.932 1	984.042 1	984.042 1, 821.987 5, 469.927 2, 351651 6	甘草皂苷 A <sub>3</sub> <sup>[16]</sup>	甘草
16	14.562	C <sub>54</sub> H <sub>92</sub> O <sub>23</sub>	1 109.202 81	1 132.187 9	1 132.187 9, 768.090 7, 425.977 5, 407.967 3	1 154.199 0	621.437 5, 459.385 0, 945.541 7, 783.487 7, 1 154.600 0, 1 107.835 6	人参皂苷 Rb <sub>1</sub> <sup>[13-14]</sup>	人参
17	16.110	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	268.073 56	269.081 1	291.062 9, 269.081 1, 253.067 0, 237.070 8, 226.076 5, 197.071 8	267.065 5	267.065 7, 252.041 7	异刺芒柄花素 <sup>[25-26]</sup>	黄芪, 甘草
18	16.783	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	276.172 54	277.180 2	277.180 1, 177.090 8, 137.060 2, 115.054 6	-	-	6-姜烯酚 <sup>[27]</sup>	生姜

续表 3

共有峰	$t_R$ /min	分子式	相对分子质量	[M+H] <sup>+</sup> /[M+Na] <sup>+</sup>		[M-H] <sup>-</sup> /[M+HCOO] <sup>-</sup>		化合物	来源
				母离子	碎片离子	母离子	碎片离子		
19	17.759	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>17</sub>	838.398 70	839.402 1	861.383 4, 839.401 7, 645.360 1, 487.341 2, 469.330 7	837.388 8	837.390 0, 661.353 3, 351.056 2, 193.034 5	甘草皂苷 G <sub>2</sub> <sup>[15]</sup>	甘草
20	18.662	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>	822.403 79	823.407 3	840.432 8, 823.406 7, 647.374 9, 471.346 2, 453.335 6, 435.325 2	821.393 3	821.395 5, 645.366 1, 351.056 0, 193.034 8	甘草皂苷 K <sub>2</sub> <sup>[20]</sup>	甘草
21	18.840	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>	822.403 79	823.407 3	823.406 3, 647.377 4, 435.336 5	821.393 4	821.395 4, 645.363 6, 351.056 2, 193.034 2	甘草酸 <sup>[15-16]</sup>	甘草
22	20.285	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	368.125 99	369.133 4	369.133 8, 313.069 7, 285.096 0, 267.083 0, 243.078 7	367.117 7	367.118 5, 309.039 9, 297.040 0, 201.018 5	甘草香豆素 <sup>[16]</sup>	甘草

### 3 讨论

《简明医彙》中保元汤煎煮方式仅记载“水煎服”，但在该书卷一要言煎丸服法中载：“煎药大法：每剂水二钟，煎八分。渣用水钟半，煎七分……”，后世医书如《医宗金鉴》<sup>[28]</sup>记载“水二钟，煎八分，食远服”等。据此初步确定煎煮2次，结合《医疗机构中药煎药室管理规范》<sup>[29]</sup>中规定滋补药“文火慢煎约40~60 min，二煎酌减”的说法，本课题组进一步进行了工艺优化和验证，最终确定每个处方一煎加水量200 mL，煎煮60 min；二煎加水量190 mL，煎煮40 min。

保元汤物质基准的化学成分较复杂，但主要为皂苷类物质，本研究采用二极管阵列检测器，分别对300, 260, 237, 203 nm等不同波长条件下指纹图谱进行了综合分析，发现单一波长下很难对物质基准中整体化学成分同时表征，其中260 nm处指纹图谱信息最丰富，但人参皂苷类成分在该波长下检测信号较弱，考虑到人参在保元汤处方中为君药，应尽量将其标志性成分在指纹图谱中体现，经分析，203 nm波长条件下人参皂苷类成分检测信号最强，故本研究同时采集了203 nm和260 nm的指纹图谱。

本研究考察了大量不同类型流动相组成对色谱图分离效果的影响：①由于203 nm波长下很多流动相具有末端吸收，故选择末端吸收较小的乙腈<sup>[30]</sup>；②由于甘草酸类成分在溶剂中极易解离并会严重影响色谱峰的峰形和分离度，因此，流动相必须呈酸性，结合后续的质谱解析考虑，选择了可挥发的甲酸<sup>[31-32]</sup>；③在203 nm处，基线极易受到流动相梯度波动的干扰，为了减少基线漂移，采用在流动相A和B中同时加甲酸的措施；④加入甲酸的比

例从0.012 5%~0.1%进行了研究，结果表明流动相A和B中均添加0.05%甲酸效果最佳。

本研究采用UPLC-PDA双波长同时检测方法系统研究了保元汤物质基准指纹图谱，该方法精密度、重复性、稳定性良好，15批物质基准与对照指纹图谱的相似度均>0.90，通过质谱解析指认了22个共有峰，这22个成分来自4味药材（人参、黄芪、甘草、生姜），说明该方法表征了保元汤组分的整体特征，可为经典名方保元汤颗粒剂的开发提供科学依据。但本研究亦存在一定局限性：①未发现来源于肉桂的指标性成分。肉桂主要成分为挥发油，但也含有黄酮、二萜类等非挥发性成分<sup>[33]</sup>，后期将进一步对未知峰进行逐一指认，以期能够找到来源于肉桂的药效物质基础，确保每味药材在保元汤物质基准中均有特征性成分体现。②由于保元汤物质基准主要成分为皂苷类成分，而此类成分的紫外吸收较弱，致使指纹图谱中部分色谱峰信号较弱，峰面积小，后期将结合紫外检测器、蒸发光散射检测器对保元汤物质基准指纹图谱进一步研究，对信号弱而含量较高的成分采用蒸发光散射检测器进行研究，同时，对物质基准中含量较高的成分开展含量测定研究，系统完成保元汤物质基准的质量标准研究。

#### [参考文献]

- [1] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录（第一批）》的通知[EB/OL]. (2018-04-13)[2020-05-18]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [2] 孙志宏. 简明医彙[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984:368.
- [3] 张雄. 保元汤对婴幼儿房间隔缺损修补术后细胞免

- 疫及肺感染的影响[J]. 黑龙江医药科学, 2019, 42(5):234-236.
- [4] 崔春风, 殷永刚, 朱青霞. 加味保元汤治疗气虚血瘀型充血性心力衰竭对患者射血分数及血浆BNP、NT-proBNP水平的影响[J]. 临床医学, 2020, 40(1):114-117.
- [5] 及孟, 李光智, 余洪, 等. 保元汤加味对心阳虚衰型冠心病心力衰竭患者血清hs-CRP及心功能的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(7):1437-1440.
- [6] 孟慧, 王启新, 屠鹏飞, 等. 保元汤调控AT1/P38 MAPK/TGF- $\beta$ 途径改善心肌纤维化防治心力衰竭的机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(5):2292-2297.
- [7] 万彦军, 廖理曦, 屠鹏飞, 等. 保元汤心肌保护作用靶点群的鉴定与功能分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19):3650-3655.
- [8] 舒泽柳, 曾克武, 屠鹏飞, 等. 保元汤中具有心肌保护作用的活性成分及其潜在作用靶点研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5):922-927.
- [9] 国家药品监督管理局. 国家药监局综合司公开征求《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求(征求意见稿)》意见[EB/OL]. (2019-03-12) [2020-05-15]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2101/335926.html>.
- [10] 马海娟, 高简, 张亚丽, 等. 基于HPLC-MS<sup>n</sup>的甘草成分快速鉴定及质谱裂解途径研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3):1120-1123.
- [11] 胡金锋, 沈凤嘉. 甘草属植物化学成分研究概况[J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(3):77-91.
- [12] ZHANG Q Y, YE M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice)[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(11):1954-1969.
- [13] 李娜, 林龙飞, 寿晓玲. LC-MS/MS分析人参茎叶提取液中人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re降解产物[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(2):197-201.
- [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] 乐文, 冯芳, 王娅. 栀子甘草豉汤的LC-PDA-MS/MS分析及抗抑郁作用研究[J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(4):342-347.
- [16] 陈佩东, 周习, 丁安伟. 炙甘草水煎液的HPLC-MS分析[J]. 中成药, 2014, 36(10):2115-2120.
- [17] 肖观林, 江洁怡, 胥爱丽, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS的布芍调脂胶囊化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14):190-199.
- [18] 张丽, 钱大玮, 卜凡淑, 等. 基于UPLC-MS的黄芪药材质量评价研究[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(4):722-732.
- [19] 朱绪民, 周燕, 丁立生, 等. 高效液相色谱-离子阱质谱分析甘草中的化学成分[J]. 分析测试学报, 2001, 20(增刊):69-70.
- [20] 黄晶. 基于UPLC/Q-TOF-MS技术的蜜炙黄芪大鼠体内代谢成分分析[D]. 广州:广东药科大学, 2017.
- [21] 李晓凤, 张少强, 刘金彪, 等. 基于UPLC/Q-TOF MS/MS的稳心颗粒主要成分分析及鉴定[J]. 天津中医药, 2020, 37(8):943-948.
- [22] ZHU D F, FANG X X, CHEN Y H, et al. Structure-activity relationship analysis of *Panax ginseng* glycoproteins with cytoprotective effects using LC-MS/MS and bioinformatics[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 158:1352-1361.
- [23] 刘巍. 蜜炙黄芪的化学成分研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2007.
- [24] 孙冬梅, 董玉娟, 胥爱丽, 等. 葛根枳椇软胶囊中黄酮类化合物的UPLC/Q-TOF-MS快速分析[J]. 中草药, 2015, 46(7):970-976.
- [25] 李婷婷. 不同产地黄芪HPLC/DAD指纹图谱及黄芪黄酮类成分谱效关系研究[D]. 银川:宁夏医科大学, 2013.
- [26] 周卿意骏, 卿志星, 蔡萍, 等. 基于HPLC-Q-TOF-MS/MS技术的银黄清肺胶囊体外物质基础研究[J]. 中草药, 2016, 47(20):3586-3593.
- [27] 梁娜, 桑亚新, 周妍, 等. HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS法分析干姜中的姜辣素类化合物[J]. 食品工业科技, 2018, 39(9):252-256.
- [28] 吴谦. 医宗金鉴[M]. 北京:人民卫生出版社, 1992:20.
- [29] 中华人民共和国卫生部, 国家中医药管理局. 医疗机构中药煎药室管理规范[Z]. 2009-03-16.
- [30] 郭社民, 马向东, 韦灵杰. 超高效液相色谱法测定参杞通脉胶囊中人参皂苷Rg<sub>1</sub>、Re和Rb<sub>1</sub>含量[J]. 中国药业, 2020, 29(7):127-129.
- [31] 孙博, 赵一帆, 朱广伟, 等. DESI-MSI在半夏泻心汤质量控制中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7):117-128.
- [32] 郭杰, 孙博, 朱广伟, 等. 基于传统煎药工艺的野菊花饮片标准汤剂制备及其质量评价方法分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6):144-149.
- [33] 林红强, 周柏松, 谭静, 等. 肉桂的化学成分、药理活性及临床应用研究进展[J]. 特产研究, 2018, 40(2):65-69.

[责任编辑 刘德文]