

· 药学基础 ·

基于UPLC-Q-TOF-MS/MS的小续命汤基准样品化学成分及指纹图谱分析

田真真¹, 张紫薇², 孙建慧³, 翟张喜¹, 李艳英^{1,2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 301617; 2. 北京盈科瑞创新医药股份有限公司, 北京 102200;
3. 北京盈科瑞创新药物研究有限公司, 北京 102200)

[摘要] 目的:建立小续命汤基准样化学成分的定性分析方法,并建立15批小续命汤基准样品指纹图谱,评价其批间质量一致性。方法:根据《古代经典名方关键信息表(25首方剂)》中小续命汤的关键信息,制备小续命汤基准样品。采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对小续命汤基准样品进行检测,通过自建数据库、查阅相关文献及与对照品鉴定所得化学成分,并通过与单味药样品及缺单味药阴性样品比对,将各成分进行归属。采用高效液相色谱法(HPLC)建立小续命汤基准样品的指纹图谱,并通过单味药样品及缺单味药阴性样品对共有色谱峰进行药味归属与指认。结果:结合质谱碎片信息、相关文献和数据库检索,从小续命汤基准样品中共鉴定和推测出64个化合物,包括31个黄酮类化合物,8个萜类化合物,12个三萜皂苷类化合物,2个苯酚类化合物,3个苯丙素类化合物,2个姜辣素类化合物,5个生物碱类化合物,1个氰苷类化合物。其中21个源自黄芩,10个源自炒甘草,9个源自人参,8个源自白芍,4个源自防风,3个源自防己,3个源自川芎,2个源自黑顺片,2个源自生姜,1个源自麻黄,1个源自燀苦杏仁。建立的小续命汤基准样品HPLC指纹图谱有23个共有峰,其中峰1、峰2来源于白芍;峰3、峰7来源于防风;峰4、峰8、峰9来源于防己;峰10、峰17、峰18、峰20、峰21来源于炒甘草;峰11~峰16、峰19、峰22来源于黄芩;峰5来源于川芎,峰23来源于生姜;峰6是黄芩和炒甘草共有成分,指认了芍药内酯苷(峰1)、芍药苷(峰2)、升麻素苷(峰3)、5-O-甲基维斯阿米醇苷(峰7)、黄芩苷(峰11)、玄参酚苷(峰13)、千层纸素A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷(峰15)、汉黄芩苷(峰16)、甘草酸(峰21)、6-姜辣素(峰23)10个化合物。15批基准样品相似度均>0.999,表明基准样品具有良好的一致性。结论:该研究通过对小续命汤基准样品中的化学成分的鉴定,明确了其物质组成以黄酮类和三萜皂苷类化合物为主,建立的指纹图谱可基本体现小续命汤基准样品的整体化学特征,可为其复方制剂的质量研究提供依据。

[关键词] 小续命汤; 基准样品; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS); 化学成分; 指纹图谱; 质量一致性; 黄酮类

[中图分类号] R22;R94;R28;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2024)17-0164-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20240865 [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://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240329.1332.004>

[网络出版日期] 2024-03-29 17:19:09

Analysis of Chemical Composition and Fingerprint of Reference Sample of Xiao Xumingtang Based on UPLC-Q-TOF-MS/MS

TIAN Zhenzhen¹, ZHANG Ziwei², SUN Jianhui³, ZHAI Zhangxi¹, LI Yanying^{1,2*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjing 301617, China;

2. Beijing Increasepharm Co. Ltd., Beijing 102200, China;

3. Beijing Increasepharm Pharmaceutical Research Co. Ltd., Beijing 102200, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a qualitative analysis method for the chemical constituents of the

[收稿日期] 2024-01-19

[基金项目] 国家重点研发计划“政府间国际科技创新合作”重点专项(2021YEE0202100)

[第一作者] 田真真,在读硕士,从事中药新药开发研究,E-mail:tianzhenzhen97@163.com

[通信作者] *李艳英,博士,高级工程师,从事中药新药开发研究,E-mail:yanyingli@ykrskj.com

reference sample of Xiao Xumingtang, and to establish the fingerprint of 15 batches of Xiao Xumingtang, so as to evaluate the quality consistency among batches. **Method:** According to the key information of Xiao Xumingtang in the *Key Information Table of Ancient Famous Classical Formulas(25 Formulas)*, the reference sample of this formula was prepared, and it was detected by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry(UPLC-Q-TOF-MS/MS). The chemical components were identified by self-constructed database, consulting relevant literature, and comparing with the reference substances, and the components were assigned by comparing with single drug samples and negative samples lacking single drug. The fingerprint of the reference sample of Xiao Xumingtang was established using high performance liquid chromatography(HPLC), and the common peaks were assigned and identified through single drug samples and negative samples lacking single drug. **Result:** Based on the information of MS fragments, relevant literature, and database retrieval, a total of 64 compounds were identified and inferred from the reference sample of Xiao Xumingtang, including 31 flavonoids, 8 terpenoids, 12 triterpenoid saponins, 2 phthalides, 3 phenylpropanoids, 2 gingerols, 5 alkaloids, and 1 cyanoside. Among them, 21 were derived from *Scutellariae Radix*, 10 from stir-fried *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, 9 from *Ginseng Radix et Rhizoma*, 8 from *Paeoniae Radix Alba*, 4 from *Saposhnikoviae Radix*, 3 from *Stephaniae Tetrandrae Radix*, 3 from *Chuanxiong Rhizoma*, 2 from *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*, 2 from *Zingiberis Rhizoma Recens*, 1 from *Ephedrae Herba*, and 1 from *Armeniacae Semen Amarum*. The established HPLC fingerprint of the reference sample of Xiao Xumingtang had 23 common peaks, among which, peaks 1 and 2 were derived from *Paeoniae Radix Alba*, peaks 3 and 7 from *Saposhnikoviae Radix*, peaks 4, 8 and 9 from *Stephaniae Tetrandrae Radix*, peaks 10, 17, 18, 20 and 21 from stir-fried *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, peaks 11-16, 19 and 22 from *Scutellariae Radix*, peak 5 from *Chuanxiong Rhizoma*, peak 23 from *Zingiberis Rhizoma Recens*, peak 6 was the common component of stir-fried *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and *Scutellariae Radix*. A total of 10 compounds including albiflorin (peak 1), paeoniflorin (peak 2), cimicifugoside (peak 3), 5-*O*-methylvisammioside (peak 7), baicalin (peak 11), sec-*O*-glucosylhamaudol (peak 13), oroxylin A-7-*O*- β -*D*-glucuronide (peak 15), wogonoside (peak 16), glycyrrhizic acid (peak 21) and 6-gingerol (peak 23) were identified. The similarities of 15 batches of reference samples were >0.999, indicating that the reference samples had good consistency. **Conclusion:** Through the identification of the chemical constituents in the reference sample of Xiao Xumingtang, it is clear that the composition of the samples is mainly composed of flavonoids and triterpenoid saponins. The established fingerprint can basically reflect the overall chemical characteristics of the reference sample of Xiao Xumingtang, which can provide a basis for the quality research of its compound preparations.

[Keywords] Xiao Xumingtang; reference samples; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS); chemical composition; fingerprint; quality consistency; flavonoids

小续命汤出自《备急千金要方》^[1],主治卒中风欲死,身体缓急,口目不正,舌强不能语,奄奄忽忽,神情闷乱等证。研究表明,小续命汤具有抗炎、抗氧化应激,保护神经细胞、神经血管单元及线粒体的作用^[2-4],对中风及其后遗症具有明显的治疗作用,对阿尔茨海默病、糖尿病周围神经病变、顽固性高血压等疾病也具有一定疗效^[5-8]。

2022年9月国家中医药管理局办公室、国家药品监督管理局综合和规划财务司发布的《古代经典名方关键信息表(25首方剂)》^[9](以下简称《关键信

息表》)对小续命汤的基原及用药部位、炮制规格、折算剂量、用法用量进行了明确要求。但自《关键信息表》公布以来,未有关于小续命汤基准样品的相关研究,仅有1篇文献报道了小续命汤古今工艺的对比研究^[10],关于小续命汤化学成分及指纹图谱的研究亦不多,部分研究所用的饮片与《关键信息表》中不一致,鉴定出化合物较少,所建立的指纹图谱分析时间较长^[11-12],尚不能满足进一步开发该经典名方的需要。基于此,本研究以《关键信息表》为标准,制备小续命汤基准样品。采用超高效液相色谱

谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对小续命汤基准样品中的化学成分进行分析鉴定,并结合分析结果,通过高效液相色谱法(HPLC)建立小续命汤基准样品的指纹图谱,结合相似度分析评价不同批次样品间的质量一致性,为小续命汤基准样品的质量控制和新药研发提供参考。

1 材料

Agilent 1290 II型超高效液相色谱仪、G6530C型四极杆-飞行时间串联质谱仪(美国安捷伦公司),LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司),DWJ-3L型低温冷阱、LGJ-10型真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司),BT25S型十万分之一电子天平、MS204TS/02万分之一电子分析天平、SQP型千分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

芍药苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵、汉黄芩苷、亥茅酚苷、黄芩苷、6-姜辣素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110736-202246、111522-202214、111523-202212、110731-202122、111714-200501、111610-202209、110715-202223、111833-202007,纯度均>94%),芍药内酯苷、千层纸素A-7-*O*- β -*D*-葡萄糖醛酸苷对照品(成都德思特生物技术有限公司,批号分别为DST220412-071、DST200802-040,纯度均 $\geq$ 95%),乙腈、甲酸为质谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

麻黄、防己、人参、黄芩、肉桂、炒甘草、白芍、川芎、燀苦杏仁、黑顺片、防风、生姜饮片均由盈科瑞(天津)创新医药研究有限公司提供,经该公司中药制药高级工程师何燕峰鉴定,基原分别为麻黄科植物草麻黄 *Ephedra sinica* 的干燥草质茎、防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* 的干燥根、五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根和根茎、唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根、樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* 的干燥树皮、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根和根茎、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* 的干燥根、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* 的干燥根茎、蔷薇科植物杏 *Prunus armeniaca* 的干燥成熟种子、毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* 子根的加工品、伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* 的干燥根、姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的新鲜根茎,均符合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。根据随机数表法将小续命汤中的12味饮片

进行随机组合及排序,组成15批小续命汤组方基准样品,15批组方对应饮片批次及编号见增强出版附加材料。

2 方法与结果

2.1 小续命汤基准样品的制备 将各药味分别粉碎成粗粒,称取麻黄13.80 g置于砂锅中,加水2 400 mL,武火煮沸3次,去沫,再分别加入防己13.80 g、人参13.80 g、黄芩13.80 g、肉桂13.80 g、炒甘草13.80 g、白芍13.80 g、川芎13.80 g、燀苦杏仁13.80 g、黑顺片15.00 g、防风20.70 g、生姜69.00 g,武火煮沸,改用文火煎煮至煎液体积约600 mL,趁热滤过,滤液减压浓缩后置于冻干机中冷冻干燥72 h,粉碎,即得15批小续命汤基准样品冻干粉,编号S1~S15。同法制备缺单味药的阴性样品。

2.2 小续命汤基准样品的化学成分分析

2.2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μ m),流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~5 min, 10%~13%B; 5~6 min, 13%~14%B; 6~7 min, 14%~15%B; 7~9 min, 15%~16%B; 9~10 min, 16%~20%B; 10~20 min, 20%~25%B; 20~30 min, 25%~55%B; 30~36 min, 55%B),流速0.2 mL $\cdot$ min⁻¹,柱温30 $^{\circ}$ C,进样量2 μ L。

2.2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),以正、负离子模式采集数据。干燥气温度350 $^{\circ}$ C,干燥气流速10 L $\cdot$ min⁻¹,雾化气压力35 psi(1 psi $\approx$ 6.895 kPa),鞘气温度350 $^{\circ}$ C,鞘气流速12 L $\cdot$ min⁻¹,毛细管电压4 kV(ESI⁺)和3.5 kV(ESI⁻),一级质谱选择MS模式,质量扫描范围 *m/z* 100~1 500,二级质谱选择Auto-MS/MS模式,质量扫描范围 *m/z* 100~1 000,碰撞能10、15、20、30 eV。

2.2.3 数据处理 收集中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、MassBank (<https://www.massbank.jp/>)、ChemSpider (<https://www.chemspider.com/>)和相关文献中有关小续命汤各单味药的化学成分信息,包括化合物的名称、分子式、结构式等,建立小续命汤化学成分的数据库。通过Agilent MassHunter B.08.00软件进行数据采集,采用Agilent Qualitative Navigator B.08.00软件和Agilent Qualitative Workflows B.08.00软件进行数据处理,通过数据库、文献及对照品对化合物进行鉴定和验证。

2.2.4 供试品溶液的制备 精密称取小续命汤基准样品S1 0.5 g,精密加入50%乙醇25 mL,密塞,称

定质量,超声处理(功率320 W,频率40 kHz,下同)30 min,取出,放冷,用50%乙醇补足减失的质量,摇匀,过0.2 μm微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.2.5 单味药供试品溶液的制备 称取麻黄、防己、人参、黄芩、肉桂、炒甘草、白芍、川芎、煨苦杏仁、黑顺片各0.2 g、防风0.3 g、生姜1 g,分别加水50 mL,煎煮30 min,滤过,减压浓缩至干,精密加入50%乙醇25 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,取出,放冷,用50%乙醇补足减失的质量,摇匀,过0.2 μm微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.2.6 阴性样品溶液的制备 精密称取小续命汤缺单味药阴性样品0.5 g,按照2.2.4项下方法制备成阴性样品溶液。

2.2.7 对照品溶液的制备 分别精密称取芍药苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸铵、汉黄芩苷、亥茅酚苷、黄芩苷、6-姜辣素、芍药内酯苷、千

层纸素A-7-*O*-β-*D*-葡萄糖醛酸苷对照品,分别加甲醇溶解,配制质量浓度分别为1、2、1、2、1、4、1、1、2 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.2.8 小续命汤基准样品化学成分定性分析 取2.2.4、2.2.5和2.2.6项下所得样品,按照2.2.1和2.2.2项下条件进行检测,按照2.2.3项下方法进行数据处理及分析,采集到正、负离子模式下的总离子流图,见增强出版附加材料。共鉴定和推测出64个化合物,包括31个黄酮类化合物,8个萜类化合物,12个三萜皂苷类化合物,2个苯酞类化合物,3个苯丙素类化合物,2个姜辣素类化合物,1个氰苷类化合物和5个生物碱类化合物。对其药味来源进行归属,其中21个源自黄芩,10个源自炒甘草,9个源自人参,8个源自白芍,4个源自防风,3个源自防己,3个源自川芎,2个源自黑顺片,2个源自生姜,1个源自麻黄,1个源自煨苦杏仁。见表1。

表1 小续命汤基准样品化学成分的鉴定

Table 1 Identification of chemical components in reference sample of Xiao Xumingtang

No.	化合物	<i>t_R</i> /min	分子式	离子模式	<i>m/z</i> 实测值	碎片离子	来源
1	苦杏仁苷 ^[13]	2.820	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	[M-H] ⁻	456.150 7	323.098 1、179.055 5	k
2	β-龙胆二糖基芍药苷 ^[14]	4.340	C ₂₉ H ₃₈ O ₁₆	[M+HCOO] ⁻	687.214 2	641.208 0、519.172 7、121.029 1	e
3	芍药内酯苷 ¹⁾ [14]	5.085	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	[M+HCOO] ⁻	525.161 4	479.156 2、121.029 3	e
4	夏佛塔苷 ^[15]	6.400	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.140 5	443.097 0、353.065 8	f
5	芍药苷 ¹⁾ [14,16]	6.400	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	[M+HCOO] ⁻	525.161 4	449.143 7、327.106 4、121.029 3	e
6	升麻素苷 ¹⁾	6.698	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	[M+HCOO] ⁻	513.161 3	467.155 1、305.101 2、161.045 3	i
7	3,6,7,2',6'-五羟基二氢黄酮 ^[17]	7.123	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	303.050 9	-	g
8	异紫堇定碱 ^[18]	8.973	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	[M-H] ⁻	340.155 4	325.130 6、310.108 5	b
9	阿魏酸 ^[19]	9.972	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.051 0	178.027 6、149.061 4	c
10	粘毛黄芩素 I ^[17]	10.685	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.035 5	257.045 5、151.003 4	g
11	甘草苷 ^[15]	10.685	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.119 1	255.066 8、135.008 6	f
12	芹糖甘草苷 ^[15]	10.685	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	[M-H] ⁻	549.160 2	417.117 3、255.066 4、135.008 6	f
13	异牡荆素-2''- <i>O</i> -鼠李糖苷 ^[20]	11.068	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	[M+H] ⁺	579.172 8	433.111 7、415.102 7、397.091 7	a
14	白杨素 6-C-葡萄糖 8-C-阿拉伯糖苷 ^[17]	11.150	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	547.145 7	457.113 1、337.071 5	g
15	升麻素 ^[11]	12.122	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	[M+H] ⁺	307.117 6	289.107 3、259.059 1	i
16	没食子酰芍药苷 ^[14]	12.512	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	[M-H] ⁻	631.166 9	491.118 2、169.013 9	e
17	洋川芎内酯J ^[19]	12.867	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	[M+H] ⁺	227.127 9	209.114 7、191.106 0、163.111 3	c
18	白杨素 8-C-葡萄糖-6-C-阿拉伯糖苷 ^[17]	13.030	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	547.145 7	457.109 8、337.069 9	g
19	毛蕊花糖苷 ^[21]	13.209	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	623.198 0	461.165 6、161.024 1	g
20	防己诺林碱 ^[22]	14.055	C ₃₇ H ₄₀ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	609.295 9	578.252 8、367.164 5、192.101 2	b
21	白杨素 8-C-葡萄糖-6-C-阿拉伯糖苷异构体	14.157	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	547.145 8	457.116 3、337.071 1	g
22	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷 ¹⁾	14.913	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₀	[M+HCOO] ⁻	497.166 2	451.160 5、271.097 3	i
23	异毛蕊花糖苷 ^[21]	14.988	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	623.197 9	461.165 7、161.024 3	g
24	汉防己甲素 ^[22]	16.543	C ₃₈ H ₄₂ N ₂ O ₆	[M+H] ⁺	623.311 0	592.269 2、192.101 1	b
25	牡丹皮苷 I ^[14]	16.697	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	479.145 1	357.117 2、121.029 9	e

续表 1

No.	化合物	t_{R}/min	分子式	离子模式	m/z 实测值	碎片离子	来源
26	5,2'-二羟基-6-甲氧基黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷 ^[23]	17.597	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	[M+H] ⁺	477.102 7	443.039 6、301.070 1	g
27	苯甲酰新乌头原碱 ^[24]	17.597	C ₃₁ H ₄₃ NO ₁₀	[M+H] ⁺	590.295 4	572.282 7、558.269 3、540.257 8	h
28	芍药新苷 ^[15]	18.135	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	461.144 5	431.132 0、339.107 8、121.028 9	e
29	甘草素-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -芹糖-4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷 ^[15]	18.435	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	[M-H] ⁻	549.161 3	417.118 7、255.066 2、135.008 4	f
30	芒柄花苷 ^[15]	18.787	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	[M+HCOO] ⁻	475.124 5	267.066 0	f
31	5,7,2',5'-四羟基-8,6'-二甲氧基黄酮 ^[17]	18.978	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	[M-H] ⁻	345.061 5	330.037 0、315.013 6	g
32	新甘草苷 ^[15]	19.222	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.119 1	255.065 7、135.007 8	f
33	黄芩苷 ^{1)[17]}	19.267	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	445.075 5	269.045 7、113.024 2	g
34	5,7,2',6'-四羟基二氢黄酮 ^[17]	19.353	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	287.056 1	161.023 3	g
35	人参皂苷 Rg ₁ ^[11]	20.247	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	[M+HCOO] ⁻	845.490 7	637.431 3、475.378 4	d
36	人参皂苷 Rc ^[11]	20.341	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	945.540 5	783.488 6、637.431 4、475.379 1	d
37	黄芩素-7- <i>O</i> - <i>D</i> -葡萄糖苷 ^[17]	20.793	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.093 5	271.061 1、113.024 3	g
38	苯甲酰次乌头原碱 ^[24]	21.129	C ₃₁ H ₄₃ NO ₉	[M+H] ⁺	574.301 5	542.274 9、510.248 0	h
39	汉黄芩素-5- <i>O</i> - <i>D</i> -葡萄糖苷 ^[17]	21.322	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M+H] ⁺	445.114 2	271.060 5、113.023 9	g
40	5,2'-二羟基-6-甲氧基黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷异构体 ^[23]	21.702	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	[M+H] ⁺	477.103 0	301.071 2、286.047 8	g
41	亥茅酚苷 ¹⁾	21.923	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₀	[M+HCOO] ⁻	483.150 8	437.144 4、257.081 7、179.055 5	i
42	白杨素-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖醛酸 ^[25]	22.340	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀	[M-H] ⁻	429.08 27	253.049 9、175.023 9、113.024 1	g
43	千层纸素 A-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖醛酸 ^{1)[25]}	22.340	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	459.093 3	283.061 8、175.024 8、113.024 6	g
44	芹菜素-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖醛酸苷 ^[25]	22.792	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	447.092 9	271.060 3	g
45	汉黄芩苷 ^{1)[25]}	23.192	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	459.089 7	283.059 5、175.024 0	g
46	甘草皂苷 A ₃ ^[15]	24.368	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	[M-H] ⁻	983.449 3	821.394 9、645.361 3、351.056 2	f
47	苯甲酰芍药苷 ^[15]	25.074	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	[M+NH ₄] ⁺	602.204 7	-	e
48	人参皂苷 Rf ^[26]	24.787	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	799.484 9	637.430 6、475.379 4	d
49	abiflofin R ₃ ^[15]	25.074	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	[M+HCOO] ⁻	629.186 5	583.172 7、461.140 7、121.028 3	e
50	22-acetoxyl-glycyrrhizin ^[15]	25.195	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	879.401 9	351.056 2、193.034 9	f
51	人参皂苷 Rb ₁ ^[11]	25.532	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	[M-H] ⁻	1 107.595 5	945.541 6、783.488 9	d
52	人参皂苷 Ra ₁ ^[26]	26.058	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	[M-H] ⁻	1 209.627 6	783.486 1	d
53	人参皂苷 Rc ^[11]	26.058	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	[M-H] ⁻	1 077.585 5	945.539 7、783.489 6	d
54	黄芩素 ^[25]	26.242	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 5	241.045 3、197.064 0	g
55	人参皂苷 Rb ₂ ^[11]	26.491	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	[M-H] ⁻	1 077.584 9	945.540 4、783.488 4	d
56	甘草皂苷 G ₂ ^[15]	26.712	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	[M-H] ⁻	837.391 6	351.055 5	f
57	人参皂苷 Rd ^[11]	27.453	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	945.542 8	783.485 6、621.438 8	d
58	丙二酰基人参皂苷 Rd ^[26]	27.838	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	[M-H] ⁻	1 031.543 8	987.551 4、945.541 2	d
59	甘草酸 ^{1)[15]}	27.867	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	821.396 5	645.363 3、351.057 1	f
60	汉黄芩素 ^[17]	30.290	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	283.060 7	268.036 1、163.003 1、110.000 9	g
61	6-姜辣素 ^{1)[27]}	30.657	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	[M-H] ⁻	293.175 8	-	j
62	6-姜烯酚 ^[28]	30.864	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	[M+H] ⁺	277.180 6	259.175 2、227.142 9、176.080 3	j
63	黄芩新素 II ^[29]	31.100	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	[M-H] ⁻	373.092 3	358.065 9、343.042 7、328.019 3、300.025 2	g
64	东莨菪内酯 ^[19]	32.394	C ₁₀ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	193.049 3	175.110 6、147.117 3	c

注: ¹⁾与对照品比对确定的化合物;a.麻黄;b.防己;c.川芎;d.人参;e.白芍;f.炒甘草;g.黄芩;h.黑顺片;i.防风;j.生姜;k.煨苦杏仁

2.3 小续命汤基准样品指纹图谱的建立

2.3.1 色谱条件 Agilent5 TC-C₁₈ (2) 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~10 min, 90%~87%B; 10~15 min, 87%~84%B; 15~25 min, 84%~82%B; 25~40 min, 82%~75%B; 40~80 min, 75%~40%B; 80~90 min, 40%B), 检测波长 240 nm, 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL。

2.3.2 精密度试验 取 2.2.4 项下供试品溶液 S1, 按 2.3.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 以黄芩苷色谱峰为参照峰(S), 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间和相对峰面积的相对标准偏差(RSD), 各共有峰相对保留时间 RSD 均<1%, 相对峰面积 RSD 均<5%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性考察 取 2.2.4 项下供试品溶液 S1, 按 2.3.1 项下色谱条件在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD, 各共有峰相对保留时间 RSD 均<1%, 相对峰面积 RSD 均<5%, 表明供试品溶液在 24 h 稳定。

2.3.4 重复性试验 精密称取小续命汤基准样品 S1, 平行 6 份, 按 2.2.4 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件进样测定, 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD, 各共有峰相对保留时间 RSD 均<1%, 相对峰面积 RSD 均<5%, 表明本方法重复性良好。

2.3.5 指纹图谱的建立及相似度评价 取 2.2.4 项下供试品溶液 S1~S15, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 得 15 批小续命汤 HPLC 指纹图谱。将 15 批小续命汤指纹图谱依次导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)软件, 以 S7 样品图谱为参照图谱, 时间窗宽度为 0.1 min, 多点校正后进行 Mark 峰匹配, 采用中位数法生成对照指纹图谱, 共确定 23 个共有峰。样品的色谱叠加图和对照指纹图谱见图 1。样品 S1~S15 与对照指纹图谱的相似度范围为 0.999~1.000, 表明 15 批小续命汤基准样品具有较好的一致性。

2.3.6 色谱峰药味归属 取 2.2.4 项下供试品溶液 S1、2.2.5 项下单味药饮片供试品溶液、2.2.6 项下阴性供试品溶液, 按 2.3.1 项下条件测定, 将供试品溶液、单味药供试品溶液及阴性供试品溶液进行比较, 对基准样品指纹图谱中的色谱峰来源药味进行归属。共归属了 23 个共有峰, 其中 8 个峰来源于黄芩(峰 11、12、13、14、15、16、19、22), 5 个峰来源于炒甘草(峰 10、17、18、20、21), 3 个峰来源于防己(峰 4、

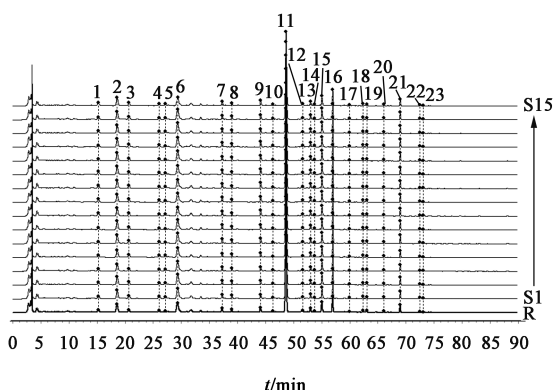


图1 15批小续命汤基准样品指纹谱(S1-S15)及对照指纹谱(R)
Fig. 1 Fingerprints of 15 batches of Xiaoxumingtang reference samples(S1-S15) and reference fingerprint(R)

8、9), 2个峰来源于防风(峰 3、7), 2个峰来源于白芍(峰 1、2), 1个峰来源于川芎(峰 5), 1个峰来源于生姜(峰 23), 峰 6 是黄芩和炒甘草共有成分, 见增强出版附加材料。

2.3.7 色谱峰指认 取 2.2.7 项下对照品溶液、2.2.4 项下基准样品供试品溶液 S1, 按 2.3.1 项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。结合 2.2.8 项下小续命汤基准样品化学成分分析结果, 共指认出 10 个色谱峰, 峰 1 为芍药内酯苷, 峰 2 为芍药苷, 峰 3 为升麻素苷, 峰 7 为 5-O-甲基维斯阿米醇苷, 峰 11 为黄芩苷, 峰 13 为亥茅酚苷, 峰 15 为千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷, 峰 16 为汉黄芩苷, 峰 21 为甘草酸, 峰 23 为 6-姜辣素, 其中峰 11 黄芩苷保留时间适中, 响应值较高, 达到基线分离, 故作为参照峰(S), 见增强出版附加材料。

3 讨论

小续命汤由麻黄、防风、防己、人参、黄芩、肉桂、白芍、川芎、煇苦杏仁、黑顺片、炒甘草、生姜 12 味药组成, 组方药味较多, 化学成分复杂, 组方后可能还会产生新的成分, 使得小续命汤中的整体化学成分变得更加复杂, 药效物质基础模糊。查阅文献发现, 关于小续命汤化学成分的研究较少, 且鉴定出的化合物较少, 未有关于小续命汤基准样品指纹图谱的研究, 在一定程度上限制了小续命汤的开发应用, 因此本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对小续命汤基准样品中的成分进行较为系统的定性分析, 并采用 HPLC 建立小续命汤基准样品的指纹图谱。

本研究从小续命汤基准样品中共鉴定和推测出 64 个化合物, 其中黄酮类成分如黄芩苷、千层纸素 A、甘草苷、升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米

醇苷等具有抗炎、抗氧化、神经保护作用^[30-32],主要来源于黄芩、炒甘草、防风;皂苷类成分如甘草酸、人参皂苷Rd、人参皂苷Rg₁等具有神经保护作用^[33-34],主要来源于炒甘草、人参;苯酚类如阿魏酸、洋川芎内酯J具有调经止痛、抗氧化、抗炎、抗脑缺血再灌注损伤作用^[35-36],主要来源于川芎;萜类如芍药苷具有抗氧化应激、抗炎,减轻脑缺血损伤,保护神经功能的作用^[37],主要来源于白芍;生物碱类如防己诺林碱具有抗炎作用^[38],主要来源于防己;此外,苯丙素类主要来源于黄芩;姜辣素类主要来源于生姜;甾苷类主要来源于燂苦杏仁。这些不同类型的化合物可能通过协同或互补等作用产生对中风及中风后遗症、阿尔茨海默病、糖尿病周围神经病变、顽固性高血压等疾病的治疗效果,从而使小续命汤发挥祛风散寒、益气温阳的作用。

在结合全方成分鉴定的基础上,本研究建立了15批小续命汤基准样品指纹图谱,并进行了相似度评价、峰归属及共有峰标定,结果15批小续命汤基准样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均≥0.999,说明批间一致性良好,共标定了23个色谱峰归属了白芍、防己、防风、黄芩、炒甘草、川芎、生姜7个药味,指认了芍药内酯苷、芍药苷、升麻素苷、玄茅酚苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、千层纸素A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷、甘草酸、6-姜辣素10个化合物。由于小续命汤中的化学成分较为繁杂且极性相差较大,在本研究中燂苦杏仁、黑顺片、麻黄、肉桂、人参没有特征峰,后期将单独建立燂苦杏仁、麻黄、肉桂、人参的指纹图谱,以期通过两张指纹图谱,指认出全方所有药味,为后续小续命汤基准样品及制剂的质量控制提供依据。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 孙思邈. 备急千金要方[M]. 天津:天津古籍出版社, 2009:8.
- [2] 付雪琴,王漫漫,兰瑞,等. 小续命汤对急性脑缺血再灌注损伤星形胶质细胞活化的影响[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(21):5830-5837.
- [3] 兰瑞. 小续命汤对急性脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及机制研究[D]. 上海:复旦大学, 2014.
- [4] 陈双龙,齐麒,杨青素,等. 小续命汤与桃红四物汤对大鼠脑缺血再灌注损伤的干预研究[J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(16):18-22.
- [5] LAN R, ZHANG Y, XIANG J, et al. Xiao-Xu-Ming decoction preserves mitochondrial integrity and

reduces apoptosis after focal cerebral ischemia and reperfusion via the mitochondrial p53 pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1):307-316.

- [6] 曾瑾,杨雨婷,王梦雷,等. 经典名方小续命汤的历史沿革及临床应用考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(6):182-191.
- [7] 黄荣春,邓新但. 小续命汤加减治疗糖尿病周围神经病变[J]. 吉林中医药, 2010, 30(1):38-39.
- [8] 张志银. 小续命汤加味祛风通络治疗顽固性高血压验案举隅[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(2):135-136.
- [9] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方关键信息表(25首方剂)》的通知[EB/OL]. (2022-9-16) [2023-12-20]. <http://www.natcm.gov.cn/kejisi/gongzuodongtai/2022-09-27/27803.html>.
- [10] 代珊,李帅,张爱军,等. 基于基准关联度和AHP-熵权法综合评价经典名方小续命汤古今提取工艺[J]. 中草药, 2022, 53(3):726-734.
- [11] 陈茜睿,杨志宏. 基于UPLC/Q-TOF-MS^E分析小续命汤有效成分组的化学成分[J]. 中国现代中药, 2017, 19(8):1111-1116.
- [12] 张爱军,代珊,李帅,等. 一种小续命汤基准样品的指纹图谱的测定方法:中国, CN113884595A[P]. 2022-01-04.
- [13] 李科友,史清华,朱海兰,等. 苦杏仁化学成分的研究[J]. 西北林学院学报, 2004, 19(2):124-126.
- [14] 谭淑瑜,肖雪,补胜华,等. 白芍水溶性成分快速鉴定研究[J]. 中药材, 2017, 40(1):94-100.
- [15] 王海强. 基于活性指数和液质联用技术的桂枝加芍药汤抗炎活性成分快速发现研究[D]. 杭州:浙江大学, 2017.
- [16] 钟林江,杨放,吴建雄,等. 基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS及谱效学的坤宁颗粒抗凝血活性质量标志物预测[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(7):168-176.
- [17] 刘晓帆. 液质联用技术应用于小柴胡汤药效物质基础研究[D]. 上海:第二军医大学, 2009.
- [18] 郭辰. 防己总生物碱组分的性味药理学评价研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2015.
- [19] 韩炜. 川芎的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2017, 19(9):1341-1349.
- [20] 左雪,洪浩,臧新钰,等. 区分3种法定基源麻黄的酚类成分HPLC特征图谱中指标成分的确定及4种成分的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(24):4873-4883.
- [21] 刘婷,孔铭,刘丽芳,等. 黄芩药材商品规格与内在质量相关性研究[J]. 中医药学报, 2018, 46(4):41-47.
- [22] 刘嘉琪,张雅男,赵婉,等. 粉防己化学成分及药理学研究进展[J]. 中医药学报, 2017, 45(3):100-103.

- [23] 刘大伟, 闫广利, 方圆, 等. UPLC-ESI-TOF/MS 应用于黄芩化学成分的快速分析[J]. 中医药信息, 2012, 29(4): 20-24.
- [24] 张定堃, 韩雪, 李瑞煜, 等. UPLC-Q-TOF-MS 分析不同产地泥附子化学成分的差异[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(3): 463-469.
- [25] 何秋毅, 宋伟峰, 马斌, 等. 高效液相色谱串联质谱分析黄芩水煎液的有效成分[J]. 中国药物经济学, 2012(5): 28-30.
- [26] 侯万超, 李赛男, 郭力菲, 等. 利用液质联用技术分析人参叶中化学成分[J]. 北方园艺, 2018(4): 145-151.
- [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] 王丽, 方磊, 赵恒强, 等. 高效液相色谱-电喷雾四级杆飞行时间质谱分析生姜中的姜辣素类化合物[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 3467-3471.
- [29] 刘春美, 唐于平, 华永庆, 等. 芩连四物汤抑制小鼠离体子宫收缩效应评价及活性部位的成分分析[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3362-3367.
- [30] 杨阳, 赵海誉, 宋建芳, 等. 黄连解毒汤化学成分及其神经细胞保护作用研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1599-1603.
- [31] 杨倩倩, 孟子盈, 王晓禹, 等. 甘草苷的提取纯化和药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2023, 42(4): 12-17.
- [32] 戴伟辰, 陈璟. 防风色原酮类化合物及药理作用研究[J]. 广东化工, 2023, 50(3): 78-80.
- [33] 刘丹平. 甘草酸的神经保护作用的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [34] 杨珊, 赵暖暖, 杨鑫, 等. 人参活性成分及药理作用研究进展[J]. 中医药导报, 2023, 29(1): 105-107, 116.
- [35] 陈琳, 朱靖, 王嵩, 等. 当归主要活性成分提取方法及其活性研究进展[J]. 上海医药, 2021, 42(9): 71-75.
- [36] 徐兰兰, 车仙花, 李宁, 等. 洋川芎内酯类化合物药理作用研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2022, 36(2): 98-102.
- [37] 刘平, 赵俊超, 李日光. 芍药苷药理作用及其机制研究进展[J]. 中医药导报, 2023, 29(8): 84-88.
- [38] 王斐然, 张会敏, 林永强, 等. 防己诺林碱药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 2022, 24(5): 476-481.

[责任编辑 李嘉麟]