

## 温胆汤 UPLC-UV-MS/MS 指纹图谱研究

王爱潮<sup>1,2</sup>, 祁东利<sup>1,2\*</sup>, 罗 配<sup>1,2</sup>, 范丽丽<sup>1,2</sup>, 刘 洋<sup>1,2</sup>, 刘志东<sup>1,2\*</sup>

1. 天津中医药大学 天津市现代中药重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 天津 300193

2. 天津中医药大学 现代中药发现与制剂技术教育部工程研究中心, 天津 300193

**摘 要:** **目的** 研究和建立温胆汤 UPLC-UV 指纹图谱, 确定色谱峰药材来源, 同时对各成分进行定性研究, 为该方物质基础和质量控制提供科学依据。 **方法** UPLC-UV 法进行温胆汤指纹图谱研究, 对 14 批样品进行相似度分析; 阴性液对照法进行共有峰药材来源研究; UPLC-MS/MS 法对温胆汤中成分进行定性研究。 **结果** 建立了温胆汤 UPLC-UV 指纹图谱, 进行了方法学考察, 结果显示该方法精密度、稳定性、重复性良好; 对 14 批样品进行指纹图谱研究, 得出共有峰指纹图谱, 标记了 22 个共有峰; 进行了 14 批样品相似度比较, 相似度在 0.863~0.998; 通过与对照品保留时间比较, 直接指认了橙皮苷、新橙皮苷、柚皮苷、甘草苷和甘草酸铵; 与药材阴性液比较, 对 22 个共有峰药材来源进行了归属; UPLC-MS/MS 法定性了橙皮苷、新橙皮苷、柚皮苷、甘草苷和甘草酸铵 5 个成分, 推断出了圣草枸橼苷、异柚皮苷、枸橼苷、乌拉尔甘草皂苷乙 4 个成分。 **结论** 建立的指纹图谱方法准确、可靠, 对温胆汤物质基础和质量控制研究提供了一定参考。

**关键词:** 温胆汤; UPLC-MS/MS; 指纹图谱; 共有峰; 橙皮苷; 新橙皮苷; 柚皮苷; 甘草苷; 甘草酸铵; 圣草枸橼苷; 异柚皮苷; 枸橼苷; 乌拉尔甘草皂苷乙

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)23-3408-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.010

## Fingerprint study of Wendan Decoction by UPLC-UV-MS/MS

WANG Ai-chao<sup>1,2</sup>, QI Dong-li<sup>1,2</sup>, LUO Pei<sup>1,2</sup>, FAN Li-li<sup>1,2</sup>, LIU Yang<sup>1,2</sup>, LIU Zhi-dong<sup>1,2</sup>

1. Tianjin Modern Chinese Medicine Key Laboratory-Province and Ministry Co-established State Key Laboratory Cultivation Base, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation Technique, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To study and establish the UPLC fingerprint of Wendan Decoction (WDD), to ascertain the medicinal source of chromatographic peaks, and to identify the chemical constituents for providing scientific basis in effective substance foundation and quality control of WDD. **Methods** The fingerprint of WDD was studied by UPLC-UV, and the similarity threshold of 14 batches of samples of WDD was analyzed; The medicinal source of common peaks was studied by negative control method; UPLC-MS/MS method was used for the qualitative analysis on chemical constituents in WDD. **Results** The UPLC fingerprint of WDD was established, the methodology was examined, and the method showed good precision, stability, and repeatability. The fingerprints of 14 batches of sample were studied and 22 common peaks were signed. The similarity threshold was compared, and it was between 0.863—0.998. Five constituents were identified as hesperidin, neohesperidin, naringin, liquiritin, and glycyrrhizic acid by comparing the retention time and ultraviolet spectra of the peaks with those of the reference substances. The attribution of 22 common peaks was analyzed by comparing with negative control. UPLC-MS/MS method was used for the qualitative analysis on hesperidin, neohesperidin, naringin, liquiritin, and glycyrrhizic acid and inferring eriocitrin, isonaringin, poncirin, and uralsaponin B. **Conclusion** The method is stable and reliable, providing a certain reference to substance basis of WDD.

**Key words:** Wendan Decoction; UPLC-MS/MS; fingerprints; common peaks; hesperidin; neohesperidin; naringin; liquiritin; glycyrrhizic acid; eriocitrin; isonaringin; poncirin; uralsaponin B

收稿日期: 2014-06-10

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-12-1068)

作者简介: 王爱潮 (1988—), 男, 在读硕士, 研究方向为中药药剂学。Tel: 13920087140 E-mail: wac0785@126.com

\*通信作者 刘志东 (1978—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事中药发现与制剂研究。Tel: (022)59596170 E-mail: lonerliuzd@163.com

祁东利 (1983—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事中药发现与制剂研究。Tel: (022)59596170 E-mail: qidongli2013@163.com

温胆汤(Wendan Decoction, WDD)为历史名方,因其疗效卓越而为历代医家广泛应用<sup>[1]</sup>。最早文献记载当为南北朝名医姚僧坦所撰的《集验方》,而为后人惯用的则为宋·陈言《三因极一病证方论》虚烦证治条下记载的温胆汤<sup>[2]</sup>,《三因方·卷九·虚烦证治》中载有温胆汤治大病后,虚烦不得眠,此胆寒故也,此药主之,又治惊悸<sup>[3]</sup>。其适应症包括“短气悸乏,或复自汗,四肢浮肿,饮食无味,心虚烦闷,坐卧不安”等,温胆汤的临床应用广泛,凡属胆虚痰热者,选用温胆汤都能收到满意的效果<sup>[4]</sup>。就温胆汤临床运用拓展思路,紧抓痰热内蕴、脾胃失运之病机,治疗耳鸣、失音、眩晕、胃痛收到了较好的疗效<sup>[5]</sup>。

目前温胆汤的质量控制方面研究较少,有报道采用紫外分光光度法测定温胆汤中总糖的量<sup>[6]</sup>,或对温胆汤中4种化学成分进行定量测定<sup>[7]</sup>,但中药复方中成分众多,不同层次药物通过多环节、多靶点发挥治疗作用,其特点为质量控制带来了挑战。中药指纹图谱具有全面性、整体性和层次性的特点,通过各种分析手段检测中药的复方成分,尽可能多地获取成分的表征信息,广泛应用于中药(中药材、提取物和复方)的质量评价和质量控制<sup>[8-10]</sup>。故本研究拟采用UPLC-UV法建立温胆汤指纹图谱,从整体上对温胆汤进行质量控制,并结合UPLC-MS/MS法对其成分进行定性分析,阐明温胆汤物质作用基础,为保证复方临床用药安全有效和质量控制研究提供科学依据。

## 1 仪器与材料

Waters Acquity 超高效液相色谱仪,配置二元高压泵、在线脱气装置、自动进样器、柱温箱、TUV检测器,美国 Waters 公司; Waters UPLC-Quattro Premier XE 三重四级杆液质联用仪,配置 Binary Solvent manager、Sample manager、Quattro Premier XE MS、Masslynx V4.1 色谱工作站,美国 Waters 公司; Sorvall ST16R 高速离心机,德国 Thermo Scientific 公司; Milli-Q 超纯水机,德国 Millipore 公司; ZDHW 型调温电热套,北京中兴伟业仪器有限公司; Mettler Toledo XP205 电子分析天平, Mettler Toledo 仪器有限公司; FA124 型天平,上海舜宇恒平有限公司。

温胆汤8味药材均购自安国市昌达中药材饮片有限公司,经天津中医药大学中医药研究中心刘志东博士鉴定,半夏(产地:四川、河北、贵州)为

天南星科半夏属植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎、竹茹(产地:广西、广东、江西)为禾本科植物青秆竹 *Bambusa tuldoidea* Munro 的茎秆的干燥中间层、陈皮(产地:广东、四川、湖南)为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮、枳实(产地:四川、江西)为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥幼果、茯苓(产地:安徽、云南)为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、甘草[产地:内蒙古伊盟杭锦旗、阿拉善盟、包头,分别记为内蒙古(1)、(2)、(3)]为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、生姜(产地:广西、贵州、山东)为姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎、大枣(产地:山东、河南、河北)为鼠李科枣属植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实。其中,半夏、枳实和甘草按照《中国药典》2010年版附录IID 炮制通则项下的姜炙、麸炒和蜜炙方法进行炮制,得到姜半夏、枳实(麸炒)和炙甘草。

橙皮苷(批号 110721-201014,其量以 95.1%计)、新橙皮苷(批号 111857-201102,其量以 99.6%计)、柚皮苷(批号 110722-201111,其量以 93.2%计)、甘草苷(批号 111610-201106,其量以 93.7%计)、甘草酸铵(批号 110731-201116,其量以 93.1%计)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯, Fisher Scientific 公司;水为超纯水;甲酸为色谱纯,天津光复精细化工研究所。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液的制备

取半夏(姜制)、竹茹、枳实(麸炒)各6g,陈皮9g,炙甘草3g,茯苓4.5g,生姜5片,大枣1枚,复方总质量40g,置于1L圆底烧瓶内,加入15倍量水,约为600mL,浸泡30min,回流提取3次,每次1.5h,合并提取液,用纱布粗滤药液,再以布氏漏斗减压滤过,合并滤液,浓缩至400mL,取1mL至离心管,10000r/min离心10min,取上清液用0.22μm微孔滤膜滤过,即得温胆汤供试品溶液。

### 2.2 对照品溶液的制备

**2.2.1 混合对照品溶液的制备** 精密称定橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、甘草苷、甘草酸铵对照品各0.5mg,全部置于5mL量瓶内,加甲醇稀释至刻度,过0.22μm微孔滤膜,即得。

**2.2.2 单一对照品溶液的制备** 精密称定橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、甘草苷、甘草酸铵对照品各 0.5 mg, 分别置于 5 mL 量瓶内, 加甲醇稀释至刻度, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 即得。

### 2.3 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液; 梯度洗脱程序: 0~5 min, 6%乙腈; 5~6 min, 6~8%乙腈; 6~10 min, 8~11%乙腈; 10~17 min, 11~16%乙腈; 17~23 min, 16%乙腈; 23~35 min, 16~45%乙腈; 35~38 min, 45~80%乙腈; 38~40 min, 80%乙腈。进样量 2  $\mu\text{L}$ , 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长 237 nm; 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.4 质谱条件

电喷雾化离子源, 负离子检测 (离子源温度为 120  $^{\circ}\text{C}$ ); 毛细管电压: 3 200 V, 质量扫描范围  $m/z$ : 100~1 000; 干燥气体积流量: 10 L/min; 干燥气温度: 300  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.5 方法学考察<sup>[11-12]</sup>

**2.5.1 精密度试验** 取同一供试品溶液, 重复进样 6 次, 分别记录色谱峰的保留时间和峰面积, 以橙皮苷峰的保留时间和峰面积为参照, 计算各共有峰的相对保留时间 ( $t_{\text{R}}$ ) 和相对峰面积, 结果表明各共有峰  $t_{\text{R}}$  及相对峰面积的 RSD 均低于 5%, 表明仪器精密度良好。

**2.5.2 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液 2  $\mu\text{L}$ , 分别在 0、3、6、9、12、24 h 进样, 分别记录色谱峰的保留时间和峰面积, 以橙皮苷峰的保留时间和峰面积为参照, 计算各共有峰的  $t_{\text{R}}$  和相对峰面积, 结果表明各共有峰  $t_{\text{R}}$  及相对峰面积的 RSD 均低于 5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.5.3 重复性试验** 按“2.1”项方法制备同一供试品溶液 6 份, 按“2.3”项色谱条件进样, 分别记录色谱峰的保留时间和峰面积, 以橙皮苷峰的保留时间和峰面积为参照, 计算各共有峰的  $t_{\text{R}}$  和相对峰面积, 结果表明各共有峰  $t_{\text{R}}$  及相对峰面积的 RSD 均低于 5%, 表明重复性良好。

### 2.6 样品测定

将处方中 8 种药材按不同产地进行排列组合, 投药制备得到 14 批温胆汤复方, 具体药材来源组成见表 1。取 14 批温胆汤复方 (S1~S14) 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.3”项下的条件进行测定, 记录色谱图。

表 1 14 批温胆汤复方的药材来源

Table 1 Sources of medicinal materials in 14 batches of WDD

| 批次  | 半夏 | 竹茹 | 陈皮 | 枳实 | 茯苓 | 甘草      | 生姜 | 大枣 |
|-----|----|----|----|----|----|---------|----|----|
| S1  | 四川 | 广东 | 广东 | 江西 | 安徽 | 内蒙古 (1) | 广西 | 河南 |
| S2  | 四川 | 广西 | 四川 | 江西 | 安徽 | 内蒙古 (2) | 广西 | 河北 |
| S3  | 四川 | 江西 | 湖南 | 四川 | 云南 | 内蒙古 (3) | 贵州 | 山东 |
| S4  | 四川 | 广西 | 广东 | 四川 | 云南 | 内蒙古 (1) | 山东 | 山东 |
| S5  | 河北 | 广东 | 四川 | 江西 | 云南 | 内蒙古 (2) | 广西 | 河北 |
| S6  | 河北 | 广西 | 广东 | 四川 | 安徽 | 内蒙古 (3) | 贵州 | 河南 |
| S7  | 河北 | 江西 | 湖南 | 江西 | 云南 | 内蒙古 (1) | 贵州 | 河北 |
| S8  | 贵州 | 广东 | 湖南 | 四川 | 安徽 | 内蒙古 (2) | 山东 | 山东 |
| S9  | 贵州 | 广西 | 四川 | 江西 | 云南 | 内蒙古 (3) | 广西 | 河南 |
| S10 | 贵州 | 江西 | 广东 | 四川 | 安徽 | 内蒙古 (1) | 山东 | 河北 |
| S11 | 贵州 | 广东 | 四川 | 四川 | 云南 | 内蒙古 (2) | 贵州 | 山东 |
| S12 | 河北 | 广西 | 湖南 | 四川 | 安徽 | 内蒙古 (3) | 贵州 | 河南 |
| S13 | 贵州 | 广西 | 湖南 | 江西 | 云南 | 内蒙古 (1) | 山东 | 山东 |
| S14 | 河北 | 广东 | 四川 | 江西 | 安徽 | 内蒙古 (2) | 贵州 | 河北 |

### 2.7 指纹图谱的建立

**2.7.1 参照物的选择** 在 UPLC 图谱中, 26 min 左右的色谱峰的峰面积最大且稳定, 经与对照品对照鉴定为橙皮苷, 故选择其为参照峰。

**2.7.2 指纹图谱的建立和相似度评价** 采用国家药典委员会的“中国指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版)”, 评价 14 批温胆汤的 UPLC 图, 确定 22 个共有峰, 建立了 14 批温胆汤指纹图谱叠加图 (图 1), 得到了温胆汤共有峰对照指纹图谱 (R), 每批样品与 R 比较, 计算出了 14 批样品的指纹图谱相似度在 0.863~0.998, 说明各批次样品的化学成分基本特征比较一致, 结果见表 2。第 14 批样品的相似度偏低, 原因是该批样品色谱峰面积与其他批次相比较有一定的差异, 这可能与该批汤剂的药材产地不同有关, 也可能与不同产地药材合煎后汤剂成分的量变化相关。由相似度比较结果可知指纹图谱技术可以很好地反映不同批次温胆汤的成分波动, 用于温胆汤的质量控制和评价。

### 2.8 温胆汤中各对照峰的指认

对各对照品分别进行 UPLC 测定, 观察各对照品的保留时间, 与温胆汤色谱图进行比较, 确定各峰对应的物质, 即 9 号峰为甘草苷, 13 号峰为柚皮苷, 14 号峰为橙皮苷, 15 号峰为新橙皮苷, 18 号峰为甘草酸铵 (图 2)。

### 2.9 温胆汤共有峰药材来源分析

分别取温胆汤全组方、温胆汤中各单味药、温胆汤各单味药阴性组方, 同法分别制成温胆汤、单

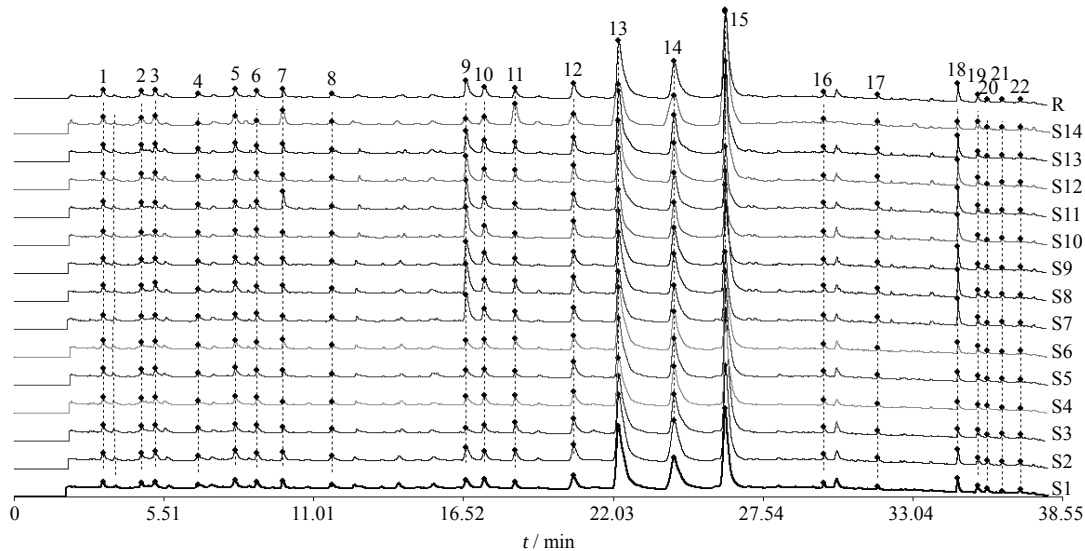


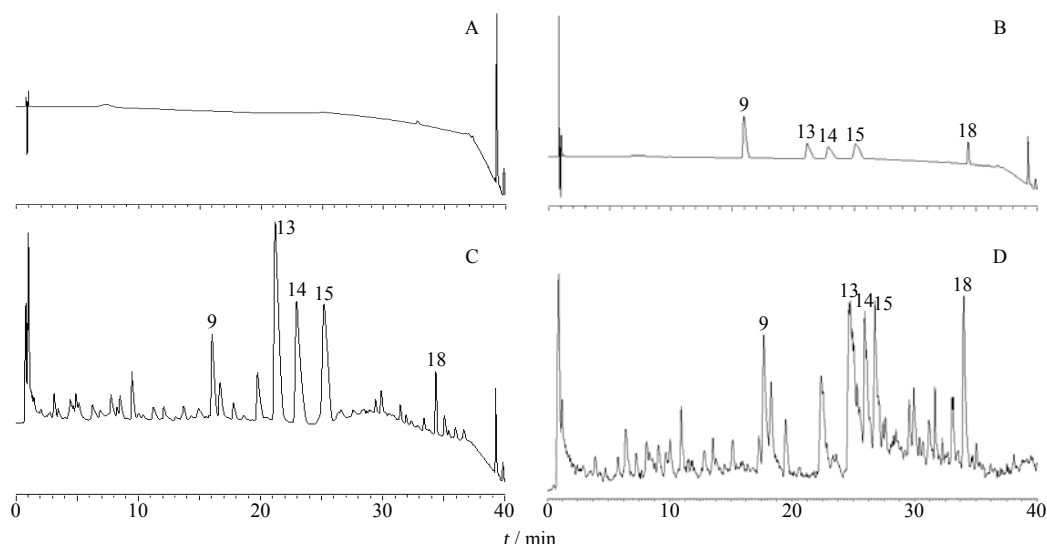
图 1 14 批温胆汤指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱 (R)  
Fig. 1 Overlap plot fingerprint of WDD and its reference fingerprint (R)

表 2 14 批样品的指纹图谱相似度  
Table 2 Similarity threshold of fingerprints in 14 batches of samples

| 样品  | 相似度   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 对照    |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|     | S1    | S2    | S3    | S4    | S5    | S6    | S7    | S8    | S9    | S10   | S11   | S12   | S13   | S14   |       |
| S1  | 1.000 | 0.995 | 0.974 | 0.971 | 0.988 | 0.996 | 0.961 | 0.949 | 0.982 | 0.962 | 0.981 | 0.976 | 0.982 | 0.897 | 0.986 |
| S2  | 0.995 | 1.000 | 0.989 | 0.989 | 0.996 | 0.997 | 0.972 | 0.974 | 0.979 | 0.967 | 0.977 | 0.990 | 0.992 | 0.933 | 0.997 |
| S3  | 0.974 | 0.989 | 1.000 | 0.994 | 0.995 | 0.986 | 0.950 | 0.984 | 0.946 | 0.937 | 0.942 | 0.988 | 0.984 | 0.968 | 0.991 |
| S4  | 0.971 | 0.989 | 0.994 | 1.000 | 0.991 | 0.983 | 0.969 | 0.985 | 0.957 | 0.955 | 0.950 | 0.987 | 0.986 | 0.963 | 0.993 |
| S5  | 0.988 | 0.996 | 0.995 | 0.991 | 1.000 | 0.996 | 0.961 | 0.977 | 0.965 | 0.953 | 0.963 | 0.989 | 0.989 | 0.948 | 0.995 |
| S6  | 0.996 | 0.997 | 0.986 | 0.983 | 0.996 | 1.000 | 0.966 | 0.967 | 0.980 | 0.962 | 0.977 | 0.988 | 0.991 | 0.926 | 0.994 |
| S7  | 0.961 | 0.972 | 0.950 | 0.969 | 0.961 | 0.966 | 1.000 | 0.965 | 0.987 | 0.995 | 0.982 | 0.975 | 0.981 | 0.895 | 0.980 |
| S8  | 0.949 | 0.974 | 0.984 | 0.985 | 0.977 | 0.967 | 0.965 | 1.000 | 0.945 | 0.952 | 0.942 | 0.992 | 0.987 | 0.972 | 0.987 |
| S9  | 0.982 | 0.979 | 0.946 | 0.957 | 0.965 | 0.980 | 0.987 | 0.945 | 1.000 | 0.991 | 0.995 | 0.971 | 0.981 | 0.867 | 0.978 |
| S10 | 0.962 | 0.967 | 0.937 | 0.955 | 0.953 | 0.962 | 0.995 | 0.952 | 0.991 | 1.000 | 0.988 | 0.968 | 0.976 | 0.869 | 0.972 |
| S11 | 0.981 | 0.977 | 0.942 | 0.950 | 0.963 | 0.977 | 0.982 | 0.942 | 0.995 | 0.988 | 1.000 | 0.969 | 0.978 | 0.863 | 0.975 |
| S12 | 0.976 | 0.990 | 0.988 | 0.987 | 0.989 | 0.988 | 0.975 | 0.992 | 0.971 | 0.968 | 0.969 | 1.000 | 0.998 | 0.952 | 0.997 |
| S13 | 0.982 | 0.992 | 0.984 | 0.986 | 0.989 | 0.991 | 0.981 | 0.987 | 0.981 | 0.976 | 0.978 | 0.998 | 1.000 | 0.941 | 0.998 |
| S14 | 0.897 | 0.933 | 0.968 | 0.963 | 0.948 | 0.926 | 0.895 | 0.972 | 0.867 | 0.869 | 0.863 | 0.952 | 0.941 | 1.000 | 0.948 |
| 对照  | 0.986 | 0.997 | 0.991 | 0.993 | 0.995 | 0.994 | 0.980 | 0.987 | 0.978 | 0.972 | 0.975 | 0.997 | 0.998 | 0.948 | 1.000 |

味药温胆汤供试品、单味药阴性供试品，按照相同的 UPLC 条件进行测定，比较三者间的指纹图谱。通过图谱比较，结果发现枳实对温胆汤指纹图谱共有峰的贡献最大，陈皮和甘草次之。其中，8 号峰来源于竹茹；1、2、4、6、12、14、16、17、19、21 号峰来源于陈皮；1、2、3、4、5、6、7、10、11、12、13、14、15、16、17、19、21、22 号峰来源于枳实；3、9、10、18、20 号峰来源于甘草；20 号峰来源于生姜；半夏、茯苓、大枣对共有峰没有

贡献。  
2.10 UPLC-MS/MS 定性分析  
采用 UPLC-MS/MS 鉴定温胆汤样品中的化学成分，温胆汤样品在负离子模式下获得准分子离子峰  $[M-H]^-$ ，在该模式下进行二级离子的质谱裂解。通过比较样品和对照品的保留时间和质谱的裂解规律来鉴定化学成分，如表 3 所示。经过质谱图与色谱图保留时间的比较以及对质谱裂解规律的分析，推断了其中的主要化学成分及其对应的编号。



A-空白溶剂 B-混合对照品 C-温胆汤样品 D-负离子模式总离子流图 9-甘草苷 13-柚皮苷 14-橙皮苷 15-新橙皮苷 18-甘草酸铵  
A-blank solvent B-mixed reference standards C-sample of WDD D-ESI-MS total ion chromatogram in negative mode 9-liquiritin  
13-naringin 14-hesperidin 15-neohesperidin 18-glycyrrhizic acid

图2 温胆汤的 UPLC-UV 图及其负离子模式总离子流图

Fig. 2 UPLC-UV and ESI-MS total ion chromatogram in negative mode of WDD

表3 温胆汤样品的质谱数据和相关化学成分的鉴定

Table 3 MS data of WDD and identification of related chemical constituents

| 编号 | t / min | 成分鉴定     | 电喷雾质谱 [M-H] <sup>-</sup> (m/z) | MS <sup>n</sup> 特征离子   |
|----|---------|----------|--------------------------------|------------------------|
| 9  | 17.696  | 甘草苷      | 417.51                         | 255.11, 135.01, 118.76 |
| 11 | 19.510  | 圣草枸橼苷    | 595.52                         | 150.79                 |
| 12 | 22.399  | 异柚皮苷     | 579.65                         | 270.83, 150.60         |
| 13 | 24.690  | 柚皮苷      | 579.71                         | 458.80, 270.76, 150.79 |
| 14 | 25.976  | 橙皮苷      | 609.69                         | 300.83                 |
| 15 | 26.751  | 新橙皮苷     | 609.69                         | 300.83                 |
| 16 | 29.569  | 枸橼苷      | 593.76                         | 284.77                 |
| 18 | 34.009  | 甘草酸      | 821.89                         | 644.11, 350.26         |
| 19 | 35.031  | 乌拉尔甘草皂苷乙 | 822.08                         | 192.59                 |

9号色谱峰的准分子离子峰  $m/z$  417.51 [M-H]<sup>-</sup>, 相对分子质量为 418.00, 分析表明, 准分子离子峰  $m/z$  417.51 [M-H]<sup>-</sup> 能够碎裂为二级离子  $m/z$  255.11、135.01、118.76, 通过分析上述的质谱裂解规律和相关的文献报道<sup>[13-14]</sup>, 鉴定 9 号色谱峰为甘草苷。

11 号色谱峰的准分子离子峰  $m/z$  595.52 [M-H]<sup>-</sup>, 相对分子质量为 596, 分析表明, 准分子离子峰  $m/z$  595.52 [M-H]<sup>-</sup> 能够碎裂为二级离子  $m/z$  150.79, 通过分析上述质谱裂解规律和相关的文献报道<sup>[15-16]</sup>, 鉴定 11 号色谱峰为圣草枸橼苷。

12 号色谱峰的准分子离子峰  $m/z$  579.65 [M-H]<sup>-</sup>, 相对分子质量为 580.00, 分析表明, 准分子离子峰  $m/z$  579.65 [M-H]<sup>-</sup> 能够碎裂为二级离子  $m/z$  270.83、150.60, 通过分析上述质谱裂解规律和相关

的文献报道<sup>[15-16]</sup>, 鉴定 12 号色谱峰为异柚皮苷。

13 号色谱峰的准分子离子峰  $m/z$  579.71 [M-H]<sup>-</sup>, 相对分子质量为 580.00, 分析表明, 准分子离子峰  $m/z$  579.71 [M-H]<sup>-</sup> 能够碎裂为二级离子  $m/z$  458.80、270.76、150.79, 通过分析上述的质谱裂解规律和相关的文献报道<sup>[15]</sup>, 鉴定 13 号色谱峰为柚皮苷。

14 号和 15 号色谱峰的准分子离子峰均为  $m/z$  609.69 [M-H]<sup>-</sup>, 相对分子质量为 610, 分析表明, 准分子离子峰  $m/z$  609.69 [M-H]<sup>-</sup> 能够碎裂为二级离子  $m/z$  300.83, 通过分析上述的质谱裂解规律和相关的文献报道<sup>[15]</sup>, 推测出此色谱峰为橙皮苷或新橙皮苷, 橙皮苷的保留时间要比新橙皮苷的保留时间提前, 所以可知, 14 号峰为橙皮苷, 15 号峰为新

橙皮苷。

16号色谱峰的准分子离子峰  $m/z$  593.76  $[M-H]^-$ , 相对分子质量为 594, 分析表明, 准分子离子峰  $m/z$  593.76  $[M-H]^-$  能够碎裂为二级离子  $m/z$  284.77, 通过分析上述质谱裂解规律和相关的文献报道<sup>[15-16]</sup>, 16号色谱峰为枸橼苷。

18号色谱峰的准分子离子峰  $m/z$  821.89  $[M-H]^-$ , 相对分子质量为 822, 分析表明, 准分子离子峰  $m/z$  821.89  $[M-H]^-$  能够碎裂为二级离子  $m/z$  644.11、350.26, 通过分析上述质谱裂解规律和相关的文献报道<sup>[13-14]</sup>, 鉴定 18号色谱峰为甘草酸。

19号色谱峰的准分子离子峰  $m/z$  822.08  $[M-H]^-$ , 相对分子质量为 823, 分析表明, 准分子离子峰  $m/z$  822.08  $[M-H]^-$  能够碎裂为二级离子  $m/z$  192.59, 通过分析上述质谱裂解规律和相关的文献报道<sup>[13]</sup>, 鉴定 19号色谱峰为乌拉尔甘草皂苷乙。

UPLC-MS/MS法定性了甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸 5 个成分, 推断出了圣草枸橼苷、异柚皮苷、枸橼苷、乌拉尔甘草皂苷乙 4 个成分。

### 3 讨论

根据古代和现代本草专著对复方各药材的道地性记载, 结合现代期刊对药材产地的质量报道, 本研究在购买药材的时候, 保证每种药材均有 1 批为道地药材, 同时结合临床应用传统和使用量再购买 2~3 批次其他产地药材, 这样复方研究所用药材就具有一定的产地和质量的代表性; 将处方中 8 种药材按不同产地进行排列组合, 投药制备得到 14 批温胆汤复方, 保证复方组成的均匀性, 更好地体现温胆汤复方的成分变化差异, 据此测定得到的温胆汤 UPLC-UV 指纹图谱才更有质量评价和控制的意义。

本实验比较了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.2%甲酸水溶液系统对出峰数目、分离度的影响, 以及对色谱峰拖尾情况的观察, 结果发现, 使用乙腈-0.1%甲酸水溶液对色谱峰分离度较好, 且甲酸易挥发的性质适用于 UPLC-MS/MS 的测定, 故最终确定了乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相。

本实验根据前期 Agilent-DAD 的 3D 图谱研究, 确定几个较好的检测波长, 分别为 210、237、251、275、283 nm, 利用 UPLC 进行单个波长测定, 综合考虑色谱峰高度、个数和分离度, 可知在 237 nm 下为最佳, 最终确定最佳检测波长为 237 nm。

本研究采用 UPLC-UV 法, 建立了可以从宏观上对温胆汤进行整体评价的指纹图谱, 同时也充分发挥了 UPLC 快速、准确、灵敏的特点, 结合 UPLC-MS/MS 法对其成分进行了定性分析<sup>[17]</sup>, 初步对温胆汤的物质作用基础进行了分析, 为保证复方临床应用安全有效和质量控制研究提供了科学依据。

### 参考文献

- [1] 马伯艳, 秦佳佳, 张福利. 浅论温胆汤之源流 [J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(3): 281-282.
- [2] 高军宁. 温胆汤之源流、类方、方证及临床应用 [J]. 甘肃中医学院学报, 2009, 26(5): 44-46.
- [3] 李春巧. 温胆汤方名探析 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(4): 160-161.
- [4] 蔡清秒. 浅谈温胆汤的临床应用 [J]. 中医临床杂志, 2007, 19(6): 552.
- [5] 樊康宏. 温胆汤临床运用体会 [J]. 甘肃中医学院学报, 2010, 27(1): 42-43.
- [6] 马建文, 葛亮. 温胆汤中总糖含量的测定 [J]. 亚太传统医药, 2010, 6(7): 14-15.
- [7] 许栋明, 程可建. RP-HPLC 同时测定温胆汤中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷和甘草酸 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(1): 45-47.
- [8] 唐峥, 毕开顺, 韩飞, 等. 栀子大黄汤 UFLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 367-372.
- [9] 罗国安, 梁琼麟, 王义明, 等. 中药指纹图谱-质量评价、质量控制与新药研发 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [10] 崔媛, 王小明, 杨勇, 等. 薏苡仁油融合指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1698-1701.
- [11] 罗国安, 梁琼麟, 王义明, 等. 中药材和饮片的高效液相色谱指纹图谱鉴别 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2004, 6(5): 11-16.
- [12] 屠鹏飞. 中药材指纹图谱的建立及技术要求实例解说 [J]. 中国药品标准, 2000, 1(4): 22-29.
- [13] 周燕, 王明奎, 廖循, 等. 甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析 [J]. 分析化学研究报告, 2004, 32(2): 174-178.
- [14] 段天旋, 马长华, 王文全, 等. HPLC-MS 法鉴定甘草的指纹图谱 [J]. 中国药师, 2009, 12(4): 173-179.
- [15] Liu W Y, Zhou C, Yan C M, et al. Characterization and simultaneous quantification of multiple constituents in *Aurantii Fructus Immaturus* extracts by HPLC-DAD-ESI-MS/MS [J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10(6): 456-463.
- [16] Wang H, Feng F. Identification of components in Zhi-Zi-Da-Huang decoction by HPLC coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, photodiode array and fluorescence detectors [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(5): 1157-1165.
- [17] 朱健, 裘一婧, 沈国芳. UPLC-MS/MS 法快速检测减肥类保健品中 13 种非法添加化学成分 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 509-515.