

基于核壳色谱技术的补阳还五汤指纹图谱构建及共有峰液质分析

曹东敏¹, 黄广泉^{1#}, 胡旭光¹, 刘伟欣⁵, 覃仁安⁵, 王淑美^{1,2,3}, 汤丹^{1,2,3*}, 兰天^{4*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点实验室, 广东 广州 510006

3. 广东省中药质量工程技术研究中心, 广东 广州 510006

4. 广东药科大学药学院, 广东 广州 510006

5. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515

摘要: 目的 基于新型核壳色谱技术建立补阳还五汤(BHD)的指纹图谱, 为其质量控制提供依据。方法 采用 Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相, 体积流量为 0.8 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长为 280 nm。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”对 15 批 BHD 指纹图谱进行评价分析。采用对照品比对和高分辨质谱技术鉴定了 21 个化合物。结果 在 38 min 内建立了 BHD 的指纹图谱, 共确定了 21 个共有峰(P1~P21), 涵盖了组方中全部 7 味药材。同时采用四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱(Q-Orbitrap HRMS/MS)、对照品及阴性方比较法对 21 个共有峰进行了归属鉴定, 其中奎宁酸甲酯(P4)、毛蕊异黄酮苷(P11)、毛蕊异黄酮苷-6"-O-丙二酸酯(P13)、芒柄花苷(P15)、(6αR,11αR)-9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷(P16)、异微凸剑叶莎醇-7-O-β-D-葡萄糖苷(P17)、毛蕊异黄酮(P18)、芒柄花素(P19)、(6αR,11αR)-9,10-二甲氧基紫檀烷(P20)、异微凸剑叶莎醇(P21)来源于黄芪; 琥珀酰基腺苷(P3)、6-羟基山柰酚-3,6-O-二葡萄糖-7-O-葡萄糖醛酸苷(P5)、山柰酚-3-O-槐糖苷(P10)来源于红花; 没食子酸(P2)、芍药苷(P9)来源于赤芍; 香草酸(P7)来源于当归; 鸟苷(P1)来源于地龙; 苦杏仁苷(P6)、野樱苷(P8)来源于桃仁; 阿魏酸(P12)、洋川芎内酯 H(P14)来源于当归和川芎。结论 首次采用核壳色谱技术建立了 BHD 的 UHPLC 指纹图谱, 方法简便、耗时短、专属性强, 并结合共有峰的高分辨质谱定性分析, 为 BHD 的质量评价及药效物质基础研究奠定了基础。

关键词: 补阳还五汤; 指纹图谱; 核壳色谱技术; 液质分析; 质量控制; 黄芪; 红花; 当归; 川芎; 赤芍; 桃仁; 地龙; 奎宁酸甲酯; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素; 异微凸剑叶莎醇; 琥珀酰基腺苷; 没食子酸; 芍药苷; 香草酸; 鸟苷; 苦杏仁苷; 野樱苷; 阿魏酸; 洋川芎内酯 H

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)21-5239-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.21.016

Establishment of fingerprint of Buyang Huanwu Decoction based on core-shell chromatography and its Q-Orbitrap HRMS/MS analysis

CAO Dong-min¹, HUANG Guang-xiao¹, HU Xu-guang¹, LIU Wei-xin⁵, QIN Ren-an⁵, WANG Shu-mei^{1,2,3}, TANG Dan^{1,2,3}, LAN Tian⁴

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Key Laboratory of Digital Quality Evaluation of Chinese Materia Medica of SATCM, Guangzhou 510006, China

3. Engineering Technology Research Center for Chinese Materia Medica Quality of Guangdong Province, Guangzhou 510006, China

4. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

5. Guangzhou Baiyun Mountain and Hutchison Whampoa Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

收稿日期: 2019-06-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(81703671); 国家自然科学基金项目(81773884); 广东省科技计划项目(2017A020213029); 广东省中医药局科研项目(20181066); 广东省联合培养研究生示范基地项目; 2017 年中央支持地方高校发展专项资金项目(众创空间建设)

作者简介: 曹东敏, 男, 硕士研究生, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: caodongmin012345@163.com

***通信作者** 汤丹, 男, 博士后, 硕士生导师, 从事中药药效物质与作用机制研究。Tel: (020)39352177 E-mail: tdpharm@126.com

兰天, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事肝纤维化疾病机制和分子药理学研究。

Tel: (020)39352123 E-mail: lantian012345@163.com

#并列第一作者 黄广泉, 男, 硕士研究生, 从事中药药效物质基础研究。E-mail: 1522327594@qq.com

Abstract: Objective To establish the fingerprint of Buyang Huanwu Decoction (BHD) based on core-shell column for its quality control. **Methods** The extract of BHD was separated on an Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm) with a gradient elution. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid. The detection wavelength was 280 nm. The similarity evaluation of 15 batches of BHD was carried out by the “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprints of TCM”. HPLC-Q-Orbitrap HRMS/MS was used to characterize the 21 chemical compounds of the extract of BHD. **Results** The chromatographic fingerprints of 15 batches of BHD were generated 21 common peaks (P1—P21), belonging to all seven medicinal herbs in 38 min. Methyl quinate (P4), calycosin-7-*O*-β-*D*-glucoside (P11), calycosin-7-*O*-β-*D*-glucoside-6"-*O*-malonate (P13), ononin (P15), (6α*R*, 11α*R*)-9,10-dimethoxypterocarpan-3-*O*-β-*D*-glucoside (P16), isomucronulatol-7-*O*-β-*D*-glucoside (P17), calycosin (P18), formononetin (P19), (6α*R*, 11α*R*)-9,10-dimethoxypterocarpan (P20), and isomucronulatol (P21) were from *Astragali Radix*. Succinyl adenosine (P3), 6-hydroxykaempferol-3,6-diglucoside (P5), and kaempferol-3-*O*-sophoroside (P10) were from *Carthami Flos*. Gallic acid (P2) and paeoniflorin (P9) were from *Paeoniae Radix Rubra*. Vanillic acid (P7) was from *Angelicae Sinensis Radix*. Guanoside (P1) was from *Pheretima*. Amygdalin (P6) and prunasin (P8) were from *Persicae Semen*. Ferulic acid (P12) and senkyunolide H (P14) were from *Angelicae Sinensis Radix* and *Chuanxiong Rhizoma*. A total of 21 components were identified by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS/MS. It was the first time to establish the UHPLC fingerprint of BHD by core-shell chromatography technology. **Conclusion** The method is simple and accurate with a good reproducibility and time consuming, which will provide a basis for the further research on effective constituents in BHD.

Key words: Buyang Huanwu Decoction; fingerprint; core-shell chromatography technology; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS/MS; quality control; *Astragali Radix*; *Carthami Flos*; *Angelicae Sinensis Radix*; *Chuanxiong Rhizoma*; *Paeoniae Radix Rubra*; *Persicae Semen*; *Pheretima*; methyl quinate; calycosin; formononetin; isomucronulatol; succinyl adenosine; gallic acid; paeoniflorin; vanillic acid; guanoside; amygdalin; prunasin; ferulic acid; senkyunolide H

补阳还五汤 (Buyang Huanwu Decoction, BHD) 始载于《医林改错》,由黄芪、当归、赤芍、川芎、桃仁、红花、地龙组成 (处方为黄芪 120 g、当归尾 6 g、赤芍 4.5 g、地龙、川芎、红花、桃仁各 3 g), 具有益气、活血、通络之功效,为气虚血瘀证脑卒中治疗的经典名方^[1-3]。现代研究表明,其具有抗血栓^[4-5]、抗氧化^[6]、抗炎^[7]和改善血液流变学^[8-9]等作用。

中药指纹图谱技术是一种国际认可的、整体的、宏观的、量化的现代中药质量控制体系的核心技术^[10-12]。中药复方成分复杂,单一或少数成分定性定量分析不能全面反映复方的整体质量,而色谱指纹图谱是对中药复方进行综合质量评价的有效手段,可以评估复方多批次间质量的一致性和稳定性^[13-15]。然而,目前报道的 BHD 指纹图谱大多数存在分析时间偏长 ($t > 100$ min) 和色谱峰未定性鉴别等不足^[16-19]。

近来基于核壳技术的色谱柱以其独特的填料结构 (由实心核和包裹实心核的多孔壳层组成),具备柱效高和柱压低的独特优势,使其在常规液相系统上也能实现与超高压液相类似的快速、高效分离效果,是一种在中药复杂成分分析领域极具前景的新兴色谱技术^[20-21],本课题组前期已将其成功运用于黄芪、虎杖等单味中药材快速分析中^[22-24]。

四级杆-静电场轨道阱质谱 (Q-Orbitrap

HRMS/MS) 为新一代的高分辨质谱,具有高选择性和高分辨准确质量数等优点的测定技术。它可以通过全扫描/正负离子切换模式进行测定,仅一次进样分析即可通过一级和二级质谱扫描的方法得到准确质量数和离子碎片等化合物鉴定所需的信息,是中药分析的有力工具^[25-27]。本研究采用新型的核壳色谱技术建立 BHD 的指纹图谱,并采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS/MS 高分辨液质联用技术鉴定共有峰成分,为 BHD 的质量综合评价提供可行方法,并为后续药效物质基础研究奠定基础。

1 材料

UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 液质联用系统,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Secura125D 型十万分之一电子天平,德国 Sartorius 公司;DK-S22 型数显恒温水浴锅,上海精宏实验设备有限公司。

对照品毛蕊异黄酮苷 (批号 CHB171102)、毛蕊异黄酮 (批号 CHB1711102)、芒柄花苷 (批号 CHB171026)、芒柄花素 (批号 CHB171026)、没食子酸 (批号 CHB171107)、芍药苷 (批号 CHB170222)、阿魏酸 (批号 CHB180206)、苦杏仁苷 (批号 CHB171011),质量分数均 > 98%,成都克洛玛生物科技有限公司。乙腈、甲酸,色谱纯,美国 Fisher 公司;其余试剂均为分析纯。

各药材购自广州各药店或药材公司,具体见表

1, 经广东药科大学马鸿雁副教授鉴定, 黄芪为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根; 当归为伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根; 赤芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根; 地龙为钜蚓科

环毛蚓属动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥全体; 川芎为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根; 红花为菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥根; 桃仁为蔷薇科樱桃属植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子。

表 1 BHD 组方中 7 味药材来源信息

Table 1 Sources of seven herbs within BHD

药材	编号	来源	批号	药材	编号	来源	批号	药材	编号	来源	批号
黄芪	A1	甘肃	181002	黄芪	A2	内蒙古	20180905	黄芪	A3	内蒙古	171203721
当归	B1	甘肃	180902	当归	B2	甘肃	20181003	当归	B2	甘肃	20180905
赤芍	C1	吉林	180901	赤芍	C2	内蒙古	20180501	赤芍	C3	内蒙古	180500401
地龙	D1	广东	180702	地龙	D2	广东	20180802	地龙	D3	广西	171202981
川芎	E1	四川	171101	川芎	E2	四川	20180802	川芎	E3	四川	180506521
红花	F1	新疆	180301	红花	F2	新疆	20180930	红花	F3	四川	170103911
桃仁	G1	河北	180701	桃仁	G2	山东	20171010	桃仁	G3	四川	180507291

1 购自广州至信药业, 2 购自同仁堂大药房, 3 购自康美大药房, 下表同

1 was purchased from Zisun, 2 was purchased from Tongren Drug Store, 3 was purchased from Kangmei Store, same as below

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~10%乙腈; 5~8 min, 10%~15%乙腈; 8~20 min, 15%~25%乙腈; 20~38 min, 25%~55%乙腈; 体积流量为 0.8 mL/min; 检测波长为 280 nm; 柱温为 30 ℃。理论塔板数以峰 11 计算为 190 000。

2.2 质谱条件

离子源: 可加热式电喷雾离子源 (HESI); 检测方式: 正、负离子模式; 喷雾电压+3 500/-3 000 V; 辅助气温度 310 ℃; 毛细管温度 320 ℃; 鞘气体积流量 13.5 L/min; 辅助气体积流量 3 L/min。一级质谱采用全扫描, *m/z* 100~1 200, 质量分辨率为 70 000, 二级质谱采用动态数据依赖性扫描。

2.3 对照品溶液的制备

精密称定毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、没食子酸、芍药苷、阿魏酸、苦杏仁苷对照品适量, 加甲醇配制成各成分质量浓度均为 0.1 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

分别称取黄芪、当归、赤芍、地龙、川芎、红花、桃仁药材 120、6、4.5、3、3、3、3 g, 加入 10

倍量水, 浸泡 30 min 后, 加热回流提取 60 min, 提取 2 次, 合并提取液, 减压浓缩至含生药量 0.285 g/mL。取浓缩液 50 mL 减压蒸干, 加 50%甲醇 10 mL 溶解, 离心取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.5 各单味药及其阴性方样品制备

按各单味药在复方组方中的配比, 分别称取各单味药材, 同“2.4”项下方法分别制备各单味药及缺各单味药的阴性方样品供试液。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度考察 取同一批供试品溶液 5 μL, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 连续进样 6 次, 以芍药苷为参照峰, 计算出各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 0.08%和小于 5.76%, 表明仪器精密度良好。

2.6.2 稳定性考察 取同一批供试品溶液 5 μL, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1”项条件下测定, 以芍药苷为参照峰, 计算出各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 小于 0.32%和小于 4.99%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.3 重现性考察 取同一批样品 6 份, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分析, 以芍药苷为参照峰, 计算出各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 小于 0.54%和小于

6.80%，表明本法的重现性良好。

2.7 指纹图谱的建立与共有峰鉴别归属

2.7.1 指纹图谱的建立 7 个药材的 3 批样品随机组合制备 15 个 BHD 样品 (S1~S15)，见表 2。对这 15 批样品进行色谱分析，采用“中药色谱指纹图谱相似评价系统”（2012 年版）进行数据分析，以

样品 S1 为参照图谱，以中位数法生成共有模式作为对照指纹图谱 (R)，见图 1。S1~S15 与 R 的相似度分别为 0.896、0.972、0.919、0.975、0.981、0.973、0.973、0.965、0.982、0.963、0.959、0.970、0.892、0.982、0.989，相似度评价分析表明，各批次 BHD 样品与对照指纹图谱间的相似度均大于 0.85，表明样品之间具有较好的一致性。

2.7.2 指纹图谱中共有峰的归属 采用保留时间、紫外图谱作为标准进行色谱峰指认，对 BHD、单味药及阴性方样品的 UHPLC 图谱中各色谱峰进行比较分析，并对 21 个共有峰进行了相应药材的来源归属：4、11、13、15~21 号峰来源于黄芪（图 2，以方中君药为例，其余同法指认）；3、5、10 号峰来源于红花；2、9 号峰来源于赤芍；7、12、14 号峰来源于当归；1 号峰来源于地龙；6、8 号峰来源于桃仁；12、14 号峰来源于川芎。

2.7.3 指纹图谱中共有峰的鉴定 采用对照品比对的方法，准确鉴定出指纹图谱中的 9 个共有峰：1、2、6、9、11、12、15、18、19 号峰分别为鸟苷、没食子酸、苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素。其余峰根据其精确相对分子质量计算其可能的分子式（误差小于 5×10^{-6} ），然后通过其特征碎片离子峰信息、归属信息以及文献报道^[28-30]，推断其可能的结构，共鉴定出 21 种共有峰成分信息，结果见表 3。

表 2 15 批 BHD 样品的信息

Table 2 Information of 15 batches of BHD samples

样品	黄芪	当归	赤芍	地龙	川芎	红花	桃仁
S1	A1	B1	C1	D1	E1	F1	G1
S2	A1	B2	C2	D2	E2	F2	G2
S3	A1	B3	C3	D3	E3	F3	G3
S4	A1	B2	C1	D1	E3	F3	G2
S5	A1	B3	C2	D2	E1	F1	G3
S6	A2	B1	C1	D2	E2	F3	G3
S7	A2	B2	C2	D3	E3	F2	G2
S8	A2	B3	C3	D1	E1	F1	G1
S9	A2	B1	C2	D3	E2	F3	G1
S10	A2	B2	C3	D1	E1	F3	G2
S11	A3	B1	C2	D1	E2	F3	G2
S12	A3	B2	C3	D2	E1	F3	G1
S13	A3	B3	C1	D3	E2	F1	G2
S14	A3	B3	C2	D1	E2	F3	G1
S15	A3	B1	C3	D2	E3	F1	G2

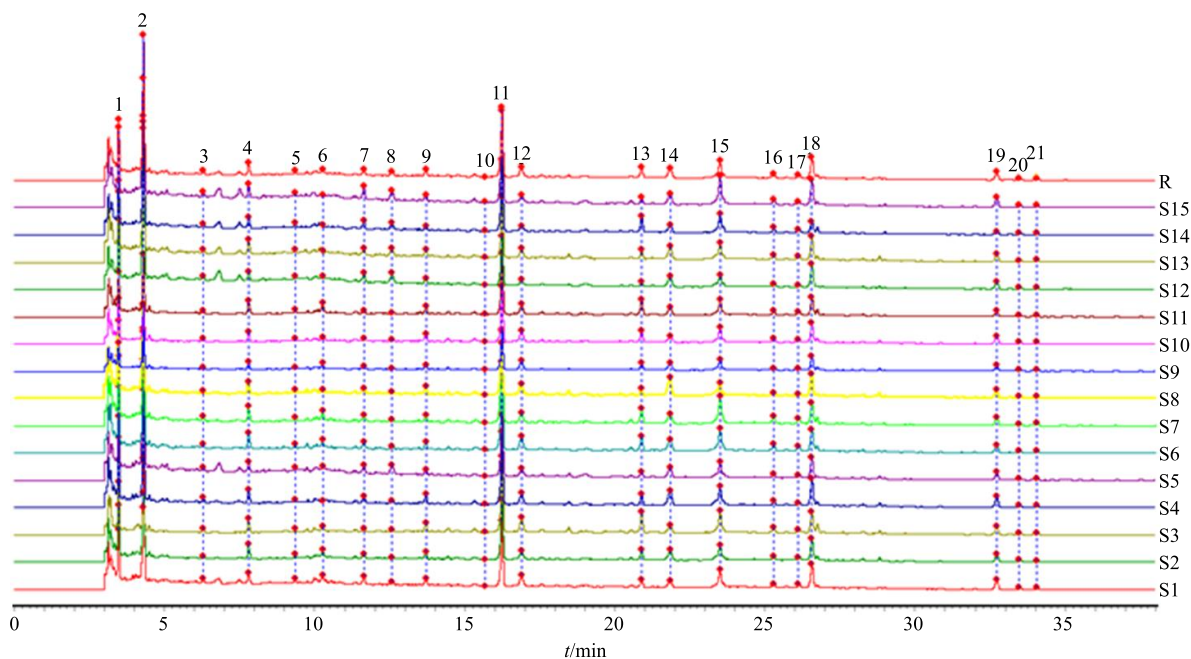


图 1 15 批 BHD 的特征指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 UPLC fingerprint of 15 batches of BHD and its reference fingerprint

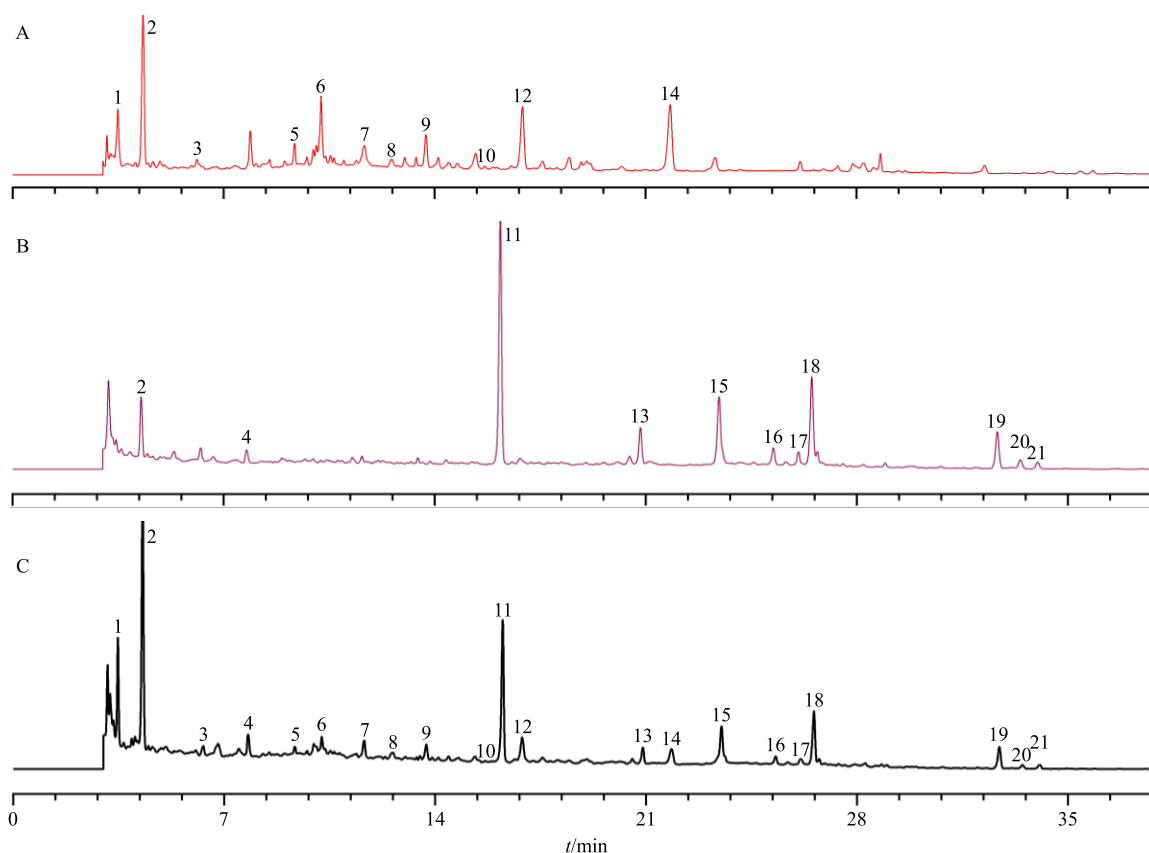


图 2 缺黄芪药材 (A)、黄芪药材 (B) 及 BHD 样品 (C) 的 UHPLC 图谱

Fig. 2 UHPLC of sample without *Radix Astragali* (A), *Astragali Radix* (B), and BHD sample (C)

3 讨论

近年来,基于核壳技术的新型色谱柱是通过特殊的制造工艺和独特的填料结构,实现了在实心核外覆盖表面多孔层,如 Agilent Poroshell 120 填料粒径为 $2.7\ \mu\text{m}$,由 $1.7\ \mu\text{m}$ 直径的实心硅胶核和 $0.5\ \mu\text{m}$ 厚的多孔外层组成。相对亚 $2\ \mu\text{m}$ 的全多孔填料,此类较高粒径填料能提供较低的柱压(比前者降低 40%~60%),然而其仍然具有较短的传质路径等其他小粒径填料的优点。与此同时,其传质阻力低,从而在高流速运行时无柱效损失^[20-21]。因此,核壳色谱柱可在较低的柱压下获得与亚 $2\ \mu\text{m}$ 全多孔 UPLC 色谱柱媲美的柱效性能,使得在常规液相系统中也能达到快速分离的效果。

目前针对 BHD 的指纹图谱分析,常规色谱分析方法时间大多超过 $100\ \text{min}$ ^[14,17-19]。而本研究采用核壳色谱技术(Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱, $250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$, $2.7\ \mu\text{m}$),成功实现了在 $38\ \text{min}$ 内建立起 BHD 指纹图谱,可见其核壳柱的色谱分离效率明显优于常规 HPLC,与 UPLC 相当。

BHD 由 7 味中药组成,化学成分复杂且性质各异。本研究以色谱峰的分离效果及峰的个数为评价指标,通过系统优化样品制备方法、流动相组成、梯度洗脱条件以及柱温、检测波长等系列参数,最终确定了 BHD 的指纹图谱方法。结果表明,对照指纹图谱中各色谱峰分离度和峰型较好,色谱峰数目较多,分布均匀,基线平稳。在此基础上,采用四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱信息并结合对照品、阴性方比对等方法,对 BHD 中的 21 个共有峰进行了鉴定和归属,结果表明共有峰来源于组方中全部 7 味中药,能较全面地反映复方中的整体化学成分信息,说明建立的指纹图谱方法代表性强。

本实验基于新型核壳色谱技术和液质联用技术,构建了经典名方 BHD 的色谱指纹图谱和共有峰组分定性鉴别相结合的质量评价方法。综合指纹图谱整体、宏观、可量化的特点,通过复方中丰富的指纹峰信息和共有峰的相似度分析,对 BHD 进行整体质量评价。进一步采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS/MS 高分辨液质联用技术,对指纹图谱中的共有特征峰组分进行了鉴定归属。

表 3 BHD 样品中共有峰的高分辨液质分析结果
Table 3 Qualitative analysis of main common peaks in BHD

峰号	t_R/min	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	裂解碎片	鉴定结果	来源	
1	3.48	282.083 3	282.083 1	[M-H] ⁻	-0.59	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	192, 152	鸟苷*	地龙
2	4.30	169.013 1	169.013 4	[M-H] ⁻	1.43	C ₇ H ₆ O ₅	125	没食子酸*	赤芍
3	6.32	382.099 3	382.098 7	[M-H] ⁻	-1.54	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₈	252, 206, 136	琥珀酰基腺苷	红花
4	7.79	205.070 7	205.070 6	[M-H] ⁻	-0.17	C ₈ H ₁₄ O ₆	143, 129, 115	奎宁酸甲酯	黄芪
5	9.35	801.172 0	801.170 2	[M-H] ⁻	-2.31	C ₃₃ H ₃₈ O ₂₃	625, 463, 299	6-羟基山柰酚-3,6- <i>O</i> -二葡萄糖-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	红花
6	10.39	502.155 5	502.154 5	[M+HCOO] ⁻	-2.02	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	323, 263	苦杏仁苷*	桃仁
7	11.64	167.033 9	167.034 1	[M-H] ⁻	1.29	C ₈ H ₈ O ₄	123	香草酸	当归
8	12.57	340.102 7	340.102 2	[M+HCOO] ⁻	-1.33	C ₁₄ H ₁₇ NO ₆	219, 161, 113	野樱苷	桃仁
9	13.67	525.160 3	525.159 0	[M+HCOO] ⁻	-2.40	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	431, 165, 121	芍药苷*	赤芍
10	15.69	609.145 0	609.143 8	[M-H] ⁻	-3.82	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	284, 255, 227	山柰酚-3- <i>O</i> -槐糖苷	红花
11	16.22	491.118 4	491.117 3	[M+HCOO] ⁻	2.21	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	283, 268, 240	毛蕊异黄酮苷*	黄芪
12	16.92	193.049 5	193.049 8	[M-H] ⁻	1.23	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	178, 134	阿魏酸*	川芎、当归
13	20.83	533.129 0	533.126 4	[M+H] ⁺	-4.68	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	285, 270, 137	毛蕊异黄酮苷-6"- <i>O</i> -丙二酸酯	黄芪
14	21.72	225.112 1	225.111 3	[M+H] ⁺	-0.83	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	207, 189, 179	洋川芎内酯 H	川芎、当归
15	23.43	475.123 5	475.122 4	[M+HCOO] ⁻	-2.27	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	267, 252	芒柄花苷*	黄芪
16	25.25	507.149 7	507.148 4	[M+HCOO] ⁻	-2.62	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₀	299, 284, 152	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i>)-9,10-二甲氧基紫檀烷-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	黄芪
17	26.07	463.159 9	463.159 1	[M-H] ⁻	-1.71	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	301, 286, 121	异微凸剑叶莎醇-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	黄芪
18	26.51	283.060 1	283.059 9	[M-H] ⁻	-0.67	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	268, 240	毛蕊异黄酮*	黄芪
19	32.65	267.065 2	267.065 1	[M-H] ⁻	-0.47	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	252, 224	芒柄花素*	黄芪
20	33.47	301.107 1	301.105 9	[M+H] ⁺	-3.82	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	167, 152, 123	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i>)-9,10-二甲氧基紫檀烷	黄芪
21	33.99	303.122 7	303.121 6	[M+H] ⁺	-3.57	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	167, 149, 123	异微凸剑叶莎醇	黄芪

*经对照品比对

*comparison of reference substance

本研究建立的 BHD 指纹图谱质量控制方法为该方的临床应用提供了质量保证, 也为后续深入开展药效物质等研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Zhang W W, Xu F, Wang D, *et al.* Buyang Huanwu Decoction ameliorates ischemic stroke by modulating multiple targets with multiple components: *In vitro* evidences [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(3): 194-202.
- [2] 肖美凤, 刘金玲, 杨岩涛, 等. 补阳还五汤的研究现状及其新药创制关键技术 [J]. *中草药*, 2018, 49(7): 1688-1694.
- [3] 沈剑刚. 从补阳还五汤治疗脑卒中谈中药复方药理学新模式及发展方向 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2018, 20(8): 172-177.
- [4] 樊启猛, 杨岩涛, 肖美凤, 等. 基于分子对接技术的补阳还五汤成分与缺血性脑卒中靶点的相互作用研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(17): 4200-4208.
- [5] 宫 丽, 张继平, 李齐欢, 等. 补阳还五汤家兔含药血清对 PAF 诱导的家兔血小板聚集的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(7): 60-61.
- [6] 张继业, 李亚楠, 常 春, 等. 补阳还五汤小鼠体内抗氧化作用的药效动力学研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(1): 96-100.
- [7] 李 黎, 郑佳新. 补阳还五汤对 AD 大鼠海马中 IL-6、TNF-α 的调节作用以及对 Aβ1-40、β-APP 蛋白表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23(11): 1038-1039.
- [8] 肖洪彬, 王 峻, 刘丽萍, 等. 补阳还五汤对老龄大鼠血液流变学的影响研究 [J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(5): 21-22.
- [9] 吴常青, 汪春彦, 邵 旭, 等. 补阳还五汤有效部位对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制 [J]. *中草药*, 2011, 42(1): 114-117.
- [10] Gao S M, Liu J S, Wang M, *et al.* Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.

- [11] 谭 鹏, 李春雨, 章从恩, 等. 超高效液相色谱法在中药分析领域中的应用现状及展望 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5938-5945.
- [12] 邹纯才, 鄢海燕. 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法 30 年 (1988—2017 年) 研究进展与展望 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(1): 1969-1977.
- [13] 姚令文, 刘 燕, 郑笑为, 等. 指纹图谱、特征图谱技术在中药材和中成药中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(8): 934-939.
- [14] 董捷鸣, 赵小梅, 马致洁, 等. 补阳还五汤高效液相色谱指纹图谱的建立 [J]. 中药材, 2017, 40(6): 1364-1367.
- [15] 林 夏, 崔培超, 王 雪, 等. 双鱼颗粒挥发性成分指纹图谱和定量分析 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2081-2086.
- [16] 周桂荣, 李 响, 赵桂铃, 等. 橘叶 UPLC 指纹图谱和化学模式识别研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(12): 2237-2241.
- [17] 黄海艳, 祝 赫, 胡大林, 等. 补阳还五汤 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(6): 814-817.
- [18] 段晓鹏, 贺福元, 周 晋, 等. 补阳还五汤指纹图谱总量统计矩加合性的研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(23): 3247-3252.
- [19] Liu E H, Qi L W, Cheng X L, *et al.* Simultaneous determination of twelve bioactive constituents in Buyang Huanwu decoction by HPLC-DAD-ELSD and HPLC-TOF/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(2): 125-131.
- [20] Tanaka N, Mccalley D V. Core-shell, ultrasmall particles, monoliths, and other support materials in high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(1): 279-298.
- [21] González-Ruiz V, Olives A I, Martín M A. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography [J]. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2015, 64: 17-28.
- [22] 汤 丹, 曹东敏, 谭兰芳, 等. 基于核壳色谱技术的黄芪中 8 种异黄酮活性成分的快速定量分析 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1410-1415.
- [23] Tang D, Shen Y B, Wang Z H, *et al.* Rapid analysis and guided isolation of *Astragalus* isoflavonoids by UHPLC-DAD-MSⁿ and their cellular antioxidant defense on high glucose induced mesangial cells dysfunction [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66: 1105-1113.
- [24] Tang D, Zhu J X, Wu A G, *et al.* Pre-column incubation followed by fast liquid chromatography analysis for rapid screening of natural methylglyoxal scavengers directly from herbal medicines: Case study of *Polygonum cuspidatum* [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1286: 102-110.
- [25] 李卓伦, 王振辉, 周 霖, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 方法的丹黄祛瘀胶囊中多种化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3705-3713.
- [26] 于舒婷, 刘海霞, 李 昆, 等. 采用 UHPLC-QExactive 轨道阱高分辨质谱快速识别脑震宁颗粒的化学成分 [J]. 药学学报, 2018, 53(4): 609-620.
- [27] 毛怡宁, 武文奇, 康 莹, 等. 酸枣仁中化学成分的 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS 快速分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(24): 150-157.
- [28] Liu E H, Qi L W, Peng Y B, *et al.* Rapid separation and identification of 54 major constituents in Buyang Huanwu decoction by ultra-fast HPLC system coupled with DAD-TOF/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2009, 23(8): 828-842.
- [29] Liao F, Meng Y, Zheng H, *et al.* Biospecific isolation and characterization of angiogenesis-promoting ingredients in Buyang Huanwu decoction using affinity chromatography on rat brain microvascular endothelial cells combined with solid-phase extraction, and HPLC-MS/MS [J]. *Talanta*, 2018, 179: 490-500.
- [30] Mekky R H, Contreras, María del Mar, *et al.* Profiling of phenolic and other compounds from Egyptian cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and antioxidant activity: A comparative study [J]. *RSC Adv*, 2015, 5(23): 17751-17767.