

• 药剂与工艺 •

基于 HPLC-Q-Exactive 液质联用技术与 HPLC 的通脉降糖胶囊成分分析及指纹图谱研究

武宇佳, 万浩芳, 李 畅, 万海同, 杨洁红*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘 要: **目的** 开发一种基于 HPLC-Q-Exactive 液质联用技术的通脉降糖胶囊 (Tongmai Jiangtang Capsule, TJC) 全局定性分析的检测方法, 同时应用液相色谱建立 TJC 的 HPLC 指纹图谱, 并对其主要成分进行定量分析, 为 TJC 的全面质量评价及质量控制提供参考依据。 **方法** 利用 Thermo Fisher Q-Exactive 液质联用系统对 TJC 化学信息进行采集, 结合数据库、文献检索及对对照品比对等手段进行 TJC 成分鉴定。采用 Capcell Pak C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 3 μm), 以 0.5% 甲酸水溶液-0.5% 甲酸乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱, 柱温 40 ℃, 体积流量 0.4 mL/min, 对 15 批次 TJC 样品进行检测, 同时建立指纹图谱, 应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版) 进行相似度评价和共有峰指认, 并对其中 8 个指标成分进行定量测定。 **结果** 利用高分辨液质联用技术共鉴定出 TJC 中 150 种化合物。15 批 TJC 的指纹图谱相似度均在 0.97 以上, 共标定 25 个共有峰, 指认其中 8 个色谱峰 (原儿茶酸、原儿茶醛、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、丹酚酸 B 以及丹参酮 II_A), 对其进行 HPLC 定量分析, 结果显示所有目标成分均线性良好 ($R^2 > 0.999$), 平均回收率均在 95.30%~103.56%, 质量分数分别为原儿茶酸 0.204~0.482 mg/g、原儿茶醛 0.345~0.516 mg/g、葛根素 5.374~8.805 mg/g、3'-甲氧基葛根素 1.148~2.075 mg/g、葛根素芹菜糖苷 1.327~2.204 mg/g、大豆苷 1.378~2.276 mg/g、丹酚酸 B 3.065~4.918 mg/g 以及丹参酮 II_A 0.412~0.594 mg/g。 **结论** 所建立的成分鉴定、指纹图谱和定量分析方法稳定可行、结果可靠, 适用于 TJC 的综合质量评价, 可为 TJC 产品的质量控制提供参考借鉴。

关键词: 通脉降糖胶囊; HPLC; 指纹图谱; 质量控制; Q-Exactive; 原儿茶酸; 原儿茶醛; 葛根素; 3'-甲氧基葛根素; 葛根素芹菜糖苷; 大豆苷; 丹酚酸 B; 丹参酮 II_A

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)21-6686-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.005

Composition analysis and fingerprint establishment of Tongmai Jiangtang Capsule based on HPLC-Q-Exactive-MS and HPLC

WU Yu-jia, WAN Hao-fang, LI Chang, WAN Hai-tong, YANG Jie-hong

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To establish a set of analytical methods for global qualitative analysis, HPLC fingerprint, and main component quantification of Tongmai Jiangtang Capsule (通脉降糖胶囊, TJC) based on HPLC-Q-Exactive-MS, so as to provide scientific evidence for overall quality evaluation and control of TJC. **Methods** In the present study, Thermo Fisher LC-Q-Exactive MS system was applied to collect MS information of the TJC components, which was further elucidated with the help of related databases, former publication and standard substances. HPLC analysis of TJC samples from 15 different batches was performed on a Capcell Pak C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) using 0.5% formic acid aqueous solution and 0.5% formic acid acetonitrile solution as mobile phases. The column temperature was 40 ℃, and the flow rate was 0.4 mL/min. Chromatographic fingerprint similarity evaluation system (2012 edition) was applied for similarity evaluation, common peak identification, and simultaneous

收稿日期: 2022-05-17

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1704200); 国家重点研发计划项目 (2018YFC1704204); 浙江省中医药科技计划项目 (2021ZQ025); 浙江省自然科学基金项目 (LR19H280001)

作者简介: 武宇佳, 硕士研究生, 主要从事中医方剂药效物质基础研究。E-mail: wuyujia1306859001@163.com

***通信作者:** 杨洁红, 博士, 教授, 主要从事中医方剂学研究。E-mail: yjhong@zcmu.edu.cn

determination of eight index components was carried out. **Results** As the result, a total of 150 compounds in TJC were identified with high resolution HPLC-MS. The fingerprint similarities of TJC samples from 15 batches were all above 0.97, and 25 shared peaks were calibrated. Eight chromatographic peaks (representing protocatechuic acid, protocatechualdehyde, puerarin, 3'-methoxypuerarin, puerarin apigenoside, daidzein, salvianolic acid B, and tanshinone II_A) were identified and quantitatively analyzed with HPLC. The results showed that all target components had good linearity ($R^2 > 0.999$), and the average recoveries were in the range of 95.30%—103.56%. The contents of protocatechuic acid, protocatechualdehyde, puerarin, 3'-methoxy puerarin, puerarin apigenoside, daidzein, salvianolic acid B and tanshinone II_A were 0.204—0.482 mg/g, 0.345—0.516 mg/g, 5.374—8.805 mg/g, 1.148—2.075 mg/g, 1.327—2.204 mg/g, 1.378—2.276 mg/g, 3.065—4.918 mg/g and 0.412—0.594 mg/g, respectively. **Conclusion** The integrated method for the qualitative, quantitative and fingerprint analysis of TJC established in this study was proven stable, feasible and reliable. It would be suitable for the comprehensive quality evaluation and control of TJC.

Key words: Tongmai Jiangtang Capsule; HPLC; fingerprint; quality control; Q-Exactive; protocatechuic acid; protocatechualdehyde; puerarin; 3'-methoxy puerarin; puerarin apigenoside; daidzein; salvianolic acid B; tanshinone II_A

通脉降糖胶囊 (Tongmai Jiangtang Capsule, TJC) 收载于国家药品监督管理局国家药品标准 [WS-11213 (ZD-1213)-2002-2012Z] [1], 国药准字 Z20026853。其以玄参、黄芪为君药, 黄连、太子参、水蛭、苍术、葛根为臣药, 丹参、山药、绞股蓝为佐药, 冬葵果为使药, 具有养阴清热、活血通络之功效, 用于气阴两虚、脉络瘀阻所致的消渴病 (糖尿病) [2]。方中君药玄参清热凉血、滋阴降火, 具有抗炎、保肝、抗氧化、抗血小板聚集等作用 [3-4]; 黄芪性温、味甘, 可补气升阳、益卫固表、托毒升肌、利水退肿, 具有保护心血管、抗肿瘤、调节免疫、抗炎、抗氧化、抗衰老等作用 [5-6]。臣药黄连清热燥湿、泻火解毒, 具有降血糖、抗菌、抗炎、抗肿瘤、调血脂等作用 [7]; 苍术祛风散寒、健脾化湿, 有抗炎症肿瘤、降血糖、抑菌 [8] 的功效; 太子参可生津润肺、益气健脾, 主要有心肌保护、免疫调节、抗氧化、降血糖、抗应激、抗疲劳、抗肿瘤、镇咳等药理作用 [9]; 葛根生津止渴、升阳止泻, 具有解热、抗炎、抗感染、降血压、降血糖、调血脂、改善生殖功能等功效 [10]; 水蛭为动物类中药, 咸、苦, 性平, 归肝经, 可破血通经、逐瘀消癥, 具有抗凝血、抗血栓、抗肿瘤、抗炎症、保护脑及细胞等功效 [11]。全方共奏燥湿化痰、活血通络、益气降糖之功。

已有研究表明, TJC 在改善糖尿病性周围神经病变的神经功能、神经组织结构方面, 具有明显的优势, 是防止糖尿病神经病变的有效药物 [12]。例如, 将 TJC 联合化学药应用于治疗 2 型糖尿病且处在脑梗死恢复期的患者, 可改善患者糖脂代谢, 下调炎症因子表达水平, 改善患者神经功能及短期预后效果 [13]。张爱旗等 [14] 观察了 106 例气阴两虚、脉络瘀阻所致的糖尿病周围神经病变患者, 发现 TJC 能改善血液流变学、神经缺血缺氧, 同时提高神经传导

速度, 改善肢体麻木疼痛、感觉减退等症状。徐静等 [15] 观察 100 例病例, 发现 TJC 能通过调节患者的血脂水平, 减少高脂血症对血管内皮的损坏, 在保护血管的同时进一步改善周围血液循环, 起到对糖尿病神经病变的防治作用。张斌等 [16] 利用糖基化终末产物诱导大鼠模型研究发现, TJC 可作用于微循环系统及神经细胞, 并可能通过抑制白细胞介素-6 及肿瘤坏死因子- α 的表达抑制雪旺细胞凋亡。但是目前关于 TJC 的研究大多集中于药理及临床疗效方面, 对其药效物质基础相关研究较少, 仅对方中黄连、黄芪以及太子参的部分成分进行评价, 未见针对 TJC 全方的化学轮廓定性分析及指标成分的定量研究。且现行质量标准中, 仅对 TJC 中的盐酸小檗碱 (来源于黄连) 进行评价 (不少于 1.25 mg/g) [1], 尚缺乏其他主要成分的质控依据。鉴于此, 本实验采用高分辨液质联用技术, 结合数据库筛查、文献检索、对照品比对等方式, 对 TJC 全方进行化学成分的定性表征, 同时建立 TJC 指纹图谱及 HPLC 多成分含量测定方法, 为 TJC 的全面质量评价和控制提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 科技有限公司; Thermo Fisher Q-Exactive 高分辨质谱仪, 连接 Ultimate 3000 高效液相色谱仪, 美国 Thermo Fisher 公司; FA2004 型电子天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Heraeus Fresco 21 离心机, 美国 Thermo Fisher 公司; DLAB MX-F 型固定式混匀仪, 北京大龙兴创实验仪器股份公司; 101-1AB 型电热鼓风干燥箱, 天津赛得利斯实验分析仪器制造厂。

1.2 药品与试剂

TJC, 批号 200803、200502、201002、210302、190301、210902、210502、210603、210401、210501、220502、220103、220701、220601、220702, 分别编号为 S1~S15, 由保定天浩制药有限公司提供。对照品: 原儿茶醛, 批号 L17A9D59027, 质量分数 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司; 原儿茶酸 (批号 A2108151, 质量分数 $\geq 97\%$)、丹参酮 II_A (批号 D1720010, 质量分数 $\geq 98\%$), 上海阿拉丁生物科技有限公司; 葛根素, 批号 RH135778, 质量分数 $\geq 98\%$, 上海易恩化学技术有限公司; 3'-甲氧基葛根素 (批号 AF20073104, 质量分数 $\geq 98\%$)、葛根素芹菜糖苷 (批号 AF20073106, 质量分数 $\geq 98\%$)、大豆苷 (批号 AF9091822, 质量分数 $\geq 98\%$)、丹酚酸 B (批号 AF20092021, 质量分数 $\geq 98\%$), 成都埃法生物科技有限公司。甲酸, 体积分数 88%, 购自上海阿拉丁生物科技有限公司; 乙腈、甲醇均为色谱纯, 购自美国天地试剂公司; 实验用水取自 Milli-Q 纯水机, Millipore 公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别取原儿茶酸、原儿茶醛、葛根素、葛根素芹菜糖苷、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 对照品适量, 精密称定, 置于同一量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 制成质量浓度分别为 0.10、0.10、1.00、0.40、0.24、0.40、1.00、0.10 mg/mL 的混合对照品储备液。精密吸取混合对照品储备液依次稀释成质量浓度为原儿茶酸 0.100、0.090、0.080、0.070、0.060、0.050、0.040、0.030、0.020、0.010 mg/mL, 原儿茶醛 0.100、0.090、0.080、0.070、0.060、0.050、0.040、0.030、0.020、0.010 mg/mL, 葛根素 1.000、0.900、0.800、0.700、0.600、0.500、0.400、0.300、0.200、0.100 mg/mL, 葛根素芹菜糖苷 0.400、0.360、0.320、0.280、0.240、0.200、0.160、0.120、0.080、0.040 mg/mL, 3'-甲氧基葛根素 0.240、0.135、0.120、0.105、0.090、0.075、0.060、0.045、0.030、0.015 mg/mL, 大豆苷 0.400、0.360、0.280、0.240、0.200、0.160、0.120、0.080、0.040、0.015 mg/mL, 丹酚酸 B 1.000、0.900、0.800、0.700、0.600、0.500、0.400、0.300、0.200、0.100 mg/mL, 丹参酮 II_A 0.100、0.090、0.080、0.070、0.060、0.050、0.040、0.030、0.020、0.010 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取 TJC 内容物适量, 混匀, 精密称取 100.0 mg, 加入 70% 甲醇 1 mL, 密塞, 称定质量。50 °C 超声提取 2 次, 每次 30 min, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 在 4 °C 下以 $13\ 800\times g$ 离心 10 min, 离心 3 次, 合并上清液, 稀释至原来的 70%, 即得供试品溶液。

2.2 利用 HPLC-Q-Exactive-MS 对 TJC 成分进行定性分析

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Capcell Pak C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μ m); 流动相 A 为 0.5% 甲酸水溶液, B 为 0.5% 甲酸乙腈溶液; 梯度洗脱: 0~18 min, 5%~18% B; 18~23 min, 18%~20% B; 23~25 min, 20%~30% B; 25~40 min, 30% B; 40~42 min, 30%~95% B; 42~52 min, 95% B; 52~53 min, 95%~5% B; 53~58 min, 5% B; 检测波长 203、260、280、310 nm; 柱温 40 °C; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 5 μ L。

2.2.2 质谱条件 使用 Thermo Fisher Q-Exactive 高分辨质谱仪, 离子源为 HESI 源。负离子检测模式: 辅助气体积流量 30 L/min, 喷雾电压 2.8 kV, 离子传输管温度 400 °C, 辅助气温度 100 °C, 碰撞能量 (CE) 为 30 eV。检测方式为 Full MS/dd-MS², 分辨率分别为 70 000 和 17 500, 扫描范围 m/z 110~1500。数据采集使用 Thermo Xcalibur 软件实现。

2.2.3 TJC 化学成分的定性分析 按照“2.1.2”项下方法制备 TJC 供试品溶液, 以“2.2.1”和“2.2.2”项下的条件对 TJC 的化学信息谱进行采集。根据高分辨质谱提供的准分子离子及二级碎片信息, 通过对照品比对、参考文献建立数据库并以 Compound Discoverer 软件进行检索比对等方式, 对各个色谱峰进行推测与鉴定。推测出 TJC 中 150 种化合物。TJC 的基峰离子流图 (base peak chromatogram, BPC) 见图 1, 各成分质谱信息见表 1。

根据鉴定结果, TJC 中化合物类别主要包括有机酸类、黄酮类、糖苷类、环烯醚萜类等。其中有机酸类包括奎宁酸、柠檬酸、香草酸、没食子酸、原儿茶酸、4-O-阿魏酰奎尼酸、咖啡酸、迷迭香酸、壬二酸、阿魏酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B 等。黄酮类化合物包含 3'-甲氧基葛根素、葛根素、3'-羟基葛根素、大豆苷、芹菜甙、芒柄花苷芒柄花素等。环烯醚萜类化合物有哈巴苷、哈巴俄苷等。

2.3 TJC 指纹图谱的建立

2.3.1 精密度考察 将批号分别为 190301、200502

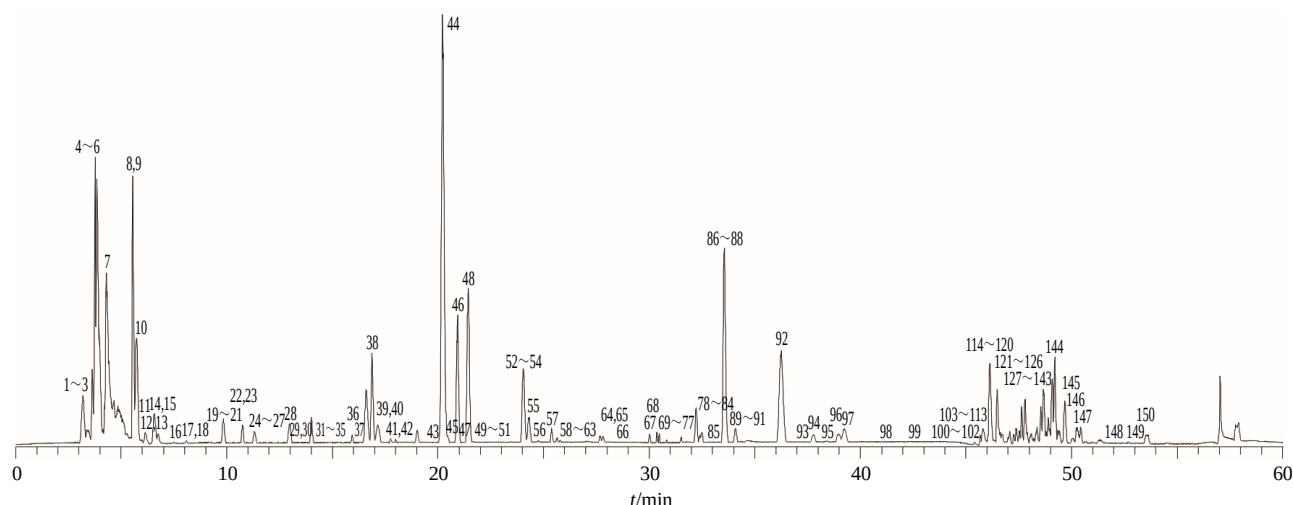


图 1 TJC 的 BPC

Fig. 1 BPC of TJC

表 1 TJC 中各成分的质谱信息

Table 1 Mass spectrometry information of components in TJC

峰号	t_R/min	成分	化学式	母离子	相对分子质量(m/z)			主要碎片 (m/z)
					理论值	实测值	偏差($\times 10^{-6}$)	
1	3.37	L-刀豆氨酸	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	175.083 1	175.083 0	-0.57	173.103 8, 146.960 4, 131.081 7
2	3.38	L-组氨酸	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	154.061 7	154.061 5	-1.30	154.061 5, 137.034 9, 93.044 6
3	3.39	L-精氨酸	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	173.103 9	173.103 8	-0.58	156.077 1, 146.960 4, 131.081 7
4	3.82	麦芽糖	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	341.108 4	341.109 0	1.76	221.066 0, 179.055 7, 119.034 0, 89.023 3
5	3.83	D-葡萄糖醛酸	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_7$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	193.034 8	193.034 8	0.00	191.055 7, 111.007 7, 103.002 6, 85.028 3
6	3.97	奎宁酸	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_6$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	191.055 6	191.055 5	-0.52	111.007 7, 103.002 6, 85.028 3
7	4.26	枸杞酸	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	337.077 1	337.078 0	2.67	277.056 7, 216.909 7, 174.016 3, 157.013 4
8	5.55	柠檬酸	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	191.019 2	191.019 1	-0.52	173.008 9, 129.018 4, 111.077 6, 87.007 6
9	5.56	尿苷	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	243.061 7	243.062 2	2.06	200.056 2, 152.034 6, 140.034 5, 110.023 7
10	5.77	2-嘧啶甲酸	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	128.071 2	128.071 7	3.90	82.028 6
11	5.97	鸟苷	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	282.083 8	282.084 9	3.90	150.041 4, 133.014 6
12	6.27	L-酪氨酸	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	180.066 1	180.066 2	0.56	163.039 4, 152.916 9, 136.871 4, 119.049 2
13	6.29	肌苷	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	267.072 9	267.074 0	4.12	230.940 8, 135.030 4, 129.018 4
14	6.40	腺苷	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	266.088 9	266.090 1	4.51	150.041 4, 135.030 3, 129.018 3
15	6.75	富马酸	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	$[2\text{M}-\text{H}]^-$	231.014 1	231.014 7	2.60	214.965 6, 188.926 8, 115.002 6, 96.958 9
16	7.58	熊果苷	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	271.081 8	271.082 9	4.06	151.039 3, 123.044 3
17	8.01	山柰苷	$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	391.124 0	391.125 5	3.84	346.051 6, 237.206 0, 191.946 1, 183.066 0
18	8.10	没食子酸	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	169.013 7	169.013 6	-0.59	126.026 9, 125.023 5
19	9.81	3,4-二氢甲基梓醇	$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	377.144 8	377.145 6	2.12	310.870 9, 219.027 3, 174.955 5, 96.959 0
20	9.84	丁香酸葡萄糖苷	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	359.097 8	359.098 8	2.78	197.045 2, 179.034 5, 72.991 9
21	9.99	梓醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	361.113 5	361.114 7	3.32	/
22	10.73	车叶草苷酸	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	431.119 0	431.119 3	0.70	385.098 1, 174.955 7, 137.023 6
23	10.74	哈巴苷	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{FA}-\text{H}]^-$	409.134 6	409.135 6	2.44	294.030 2, 201.076 6, 183.065 9, 89.023 3
24	11.16	泛酸	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	218.102 8	218.103 3	2.29	190.986 9, 146.081 5, 88.039 2
25	11.29	香草酸	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	167.034 4	167.034 4	0.00	149.023 6, 139.039 2, 123.044 3
26	11.31	丹参素	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	197.045 0	197.045 1	0.51	179.034 5, 135.044 3, 123.044 2, 72.991 9

续表 1

峰号	tr/min	成分	化学式	母离子	相对分子质量(<i>m/z</i>)			主要碎片 (<i>m/z</i>)
					理论值	实测值	偏差($\times 10^{-6}$)	
27	11.31	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.034 4	179.034 4	0.00	152.916 9, 135.044 3, 96.959 0
28	12.96	原儿茶酸	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.018 8	153.018 6	-1.31	126.902 7, 110.031 8, 109.028 4, 96.958 9
29	12.97	龙胆酸	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.018 8	153.018 5	-1.96	110.031 8, 109.028 5
30	13.31	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.150 6	593.152 2	2.70	473.109 7, 430.091 0, 310.048 8
31	14.01	葛根素-4'- β -D-葡萄糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	577.155 7	577.157 0	2.25	457.114 9, 429.119 7, 294.593 8
32	14.74	肉苁蓉苷 F	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	487.145 2	487.146 6	2.87	304.915 7, 179.034 5, 161.023 9, 135.044 3
33	15.00	香叶木苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	[M-H] ⁻	607.166 3	607.168 3	3.29	487.125 9, 324.064 3
34	15.53	L-色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M-H] ⁻	203.082 1	203.082 4	1.48	176.897 6, 160.888 8, 116.049 5, 102.555 0
35	15.56	梔子苷酸	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	373.113 5	373.114 8	3.48	211.061 0, 174.955 6, 123.044 3
36	15.94	水仙苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	623.161 2	623.162 6	2.25	415.104 2, 295.061 6, 252.043 2
37	16.07	6- <i>O</i> -甲基梓醇	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	375.129 1	375.130 3	3.20	326.143 0, 238.873 4, 191.946 7, 174.955 4
38	16.88	染料木苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.097 8	431.098 7	2.09	311.056 7, 283.061 8
39	17.15	原儿茶醛	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.023 9	137.023 6	-2.19	134.864 6
40	17.41	表儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	289.071 2	289.072 3	3.81	271.095 3, 174.955 6, 158.978 0, 146.960 4, 130.983 0
41	17.75	3-吡啶丙烯酸	C ₁₁ H ₉ NO ₂	[M-H] ⁻	186.055 5	186.055 6	0.54	158.934 0, 142.065 5
42	17.76	隐绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.087 3	353.088 5	3.40	193.060 6, 192.059 2, 135.044 6
43	20.03	对羟基苯乙酸	C ₈ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	151.039 5	151.039 4	-0.66	122.950 8, 109.028 5, 84.023 1
44	20.22	葛根素	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	415.102 9	415.103 5	1.45	267.066 7, 295.061 5
45	20.63	4-羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	163.039 5	163.039 3	-1.23	138.928 5, 136.931 4, 121.028 6, 96.959 0
46	20.93	葛根素芹菜糖苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	547.145 2	547.146 1	1.64	325.072 4, 295.061 6, 267.066 8
47	21.27	山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.092 7	447.094 2	3.36	325.072 4, 297.076 8, 174.955 8
48	21.39	3'-甲氧基葛根素	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	445.113 5	445.114 4	2.02	327.051 2, 326.075 9, 297.076 8, 174.955 7
49	21.43	3'-甲氧基-5'-羟基异黄酮-7- β -D-葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	445.113 5	445.114 3	1.80	326.075 8, 297.077 3, 282.053 8
50	21.48	西伯利亚远志糖 A5	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	517.155 7	517.158 1	4.64	445.114 8, 398.996 1, 325.072 4
51	21.64	紫堇定	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	[M-H] ⁻	340.154 9	340.155 9	2.94	325.132 5, 310.109 0, 267.066 4
52	24.04	高车前苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	461.108 4	461.109 4	2.17	415.104 3, 253.050 8
53	24.04	4- <i>O</i> -阿魏酰奎尼酸	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	367.102 9	367.103 7	2.18	193.050 3, 173.045 0
54	24.09	大豆苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	415.102 9	415.104 2	3.13	296.061 5, 254.053 4, 252.043 1
55	24.31	3- <i>O</i> -阿魏酰奎尼酸	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	367.102 9	367.103 9	2.72	191.055 7, 173.045 1, 93.033 4
56	24.74	4 β -羟基黄芩紫檀烷苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	479.155 3	479.156 4	2.30	327.108 7, 165.055 1, 121.028 5
57	25.38	芹菜苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.140 1	563.141 3	2.13	341.067 3, 311.056 7, 283.062 0
58	25.95	玄参苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	591.171 4	591.172 9	2.54	/
59	26.33	金丝桃苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	463.087 7	463.089 3	3.46	327.861 9, 301.035 6, 191.945 7, 174.955 6, 89.023 2
60	26.64	darendoside B	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₂	[M-H] ⁻	475.181 6	475.182 8	2.53	341.016 1, 314.773 8, 273.030 7, 205.071 1, 163.061 0
61	27.08	咖啡酸乙酯	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	207.065 7	207.066 1	1.93	192.042 5, 135.044 4, 122.036 5
62	27.09	肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₂	[M-H] ⁻	147.044 6	147.044 4	-1.36	120.953 9, 118.965 3, 90.970 3, 61.987 2
63	27.10	莨菪亭	C ₁₀ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	191.034 4	191.034 5	0.52	163.950 7, 135.044 4, 111.007 8, 61.987 2
64	27.68	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	609.145 6	609.146 8	1.97	300.028 1, 178.998 1
65	27.81	喹果黄素	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	491.119 0	491.120 0	2.04	283.061 6, 269.042 0
66	28.53	7-羟基香豆素	C ₉ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	161.023 9	161.023 8	-0.62	133.028 7, 130.982 8, 102.987 6
67	30.11	斩龙剑苷 A	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₂	[M-H] ⁻	471.150 3	471.151 3	2.12	383.384 2, 325.033 8, 269.046 1, 147.044 4

续表 1

峰号	t _R /min	成分	化学式	母离子	相对分子质量(<i>m/z</i>)			主要碎片 (<i>m/z</i>)
					理论值	实测值	偏差(×10 ⁻⁶)	
68	30.37	毛蕊花糖苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	623.197 6	623.199 2	2.57	579.150 2, 461.168 0, 161.023 8
69	30.65	(S)-柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	271.060 6	271.061 8	4.43	241.050 7, 201.022 6, 186.929 5
70	30.66	松脂醇葡萄糖苷	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	519.186 6	519.188 4	3.47	445.231 8, 357.134 9, 248.900 8, 151.039 4
71	30.86	柚皮苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	579.171 4	579.172 9	2.59	417.156 1, 402.132 7, 291.064 2, 181.050 1
72	30.88	异绿原酸 A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	515.119 0	515.120 3	2.52	253.050 6, 191.055 7, 174.955 6, 171.055 7
73	31.14	安格洛昔 C	C ₃₆ H ₄₈ O ₁₉	[M-H] ⁻	783.271 2	783.273 1	2.43	764.644 8, 461.167 8, 193.050 4, 175.039 6
74	31.36	ningposide A	C ₁₈ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	381.118 6	381.119 8	3.15	362.933 6, 193.050 3, 174.955 4, 149.060 1, 134.036 5
75	31.49	柚皮素-7-O-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	433.113 5	433.114 6	2.54	389.085 8, 311.056 2, 269.041 1, 178.998 2
76	31.59	肉苁蓉苷 C	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	[M-H] ⁻	637.213 2	637.215 1	2.98	553.469 8, 304.914 8, 223.061 3, 161.023 8
77	31.63	丹酚酸 E	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	717.145 6	717.147 8	3.07	339.051 5, 321.041 1, 295.061 8, 185.024 0
78	32.03	桂叶苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₃	[M-H] ⁻	591.207 8	591.209 7	3.21	473.125 4, 304.914 6, 174.955 6
79	32.03	scrophuloside A2	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₇	[M-H] ⁻	695.218 7	695.220 6	2.73	678.358 9, 599.312 1, 419.135 7, 145.028 8
80	32.15	ningposide C	C ₁₇ H ₂₀ O ₈	[M-H] ⁻	351.108 0	351.109 3	3.70	328.062 2, 163.040 0, 145.028 8, 119.049 3
81	32.23	迷迭香酸	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	[M-H] ⁻	359.076 7	359.077 8	3.06	197.045 3, 179.034 6, 161.023 8, 135.044 4
82	32.39	丹酚酸 A	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	493.113 5	493.114 8	2.64	295.061 7, 197.045 1, 185.024 0, 109.028 5
83	32.39	丹酚酸 I	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	[M-H] ⁻	537.103 3	537.104 7	2.61	295.061 7, 185.024 0, 109.028 5, 61.987 2
84	32.48	壬二酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	[M-H] ⁻	187.097 0	187.097 0	0.00	169.086 5, 125.096 3, 97.064 8
85	33.00	二氢阿魏酸	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	195.065 7	195.066 5	4.10	182.022 0, 152.896 4, 128.034 6, 122.036 4
86	33.46	邻苯二甲酸	C ₈ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	165.018 8	165.018 7	-0.61	136.931 4, 121.028 6, 96.959 0
87	33.55	丹参酚酸 B	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	717.145 6	717.146 9	1.81	339.051 5, 321.041 1, 295.061 6, 185.024 0
88	33.60	羟甲香豆素	C ₁₀ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	175.039 5	175.039 1	-2.29	160.016 1, 146.960 5, 118.965 3
89	34.03	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.050 1	193.050 2	0.52	163.950 7, 134.036 6, 111.007 8, 61.987 2
90	34.08	黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	445.077 1	445.078 4	2.92	310.871 1, 269.046 2, 174.955 7
91	34.08	芒柄花苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	[M+FA-H] ⁻	475.124 0	475.125 0	2.10	267.066 8
92	36.25	白杨素	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	253.050 1	253.050 8	2.77	209.059 6, 149.144 5
93	37.40	甘草素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255.065 7	255.066 6	3.53	186.929 0, 153.018 6, 135.007 9, 119.049 2
94	37.79	7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基-异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	[M-H] ⁻	463.160 4	463.161 9	3.24	301.108 6, 287.088 8, 135.044 4, 121.028 5
95	38.40	哈巴俄苷	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	493.171 0	493.172 3	2.64	165.055 2, 147.044 4, 89.023 3
96	38.97	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.034 8	301.035 8	3.32	273.040 8, 178.998 1, 151.002 9, 121.028 5
97	39.25	金合欢素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	283.060 6	283.061 5	3.18	268.038 2
98	41.54	龍膽根素	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	257.045 0	257.045 7	2.72	221.842 2, 186.928 9, 163.003 1, 135.007 9
99	42.70	熊竹素	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	313.071 2	313.072 1	2.87	298.048 8, 283.025 6, 174.955 6, 146.960 2
100	45.42	黄芪皂苷 VI	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₉	[M-H] ⁻	945.505 9	945.507 0	1.16	/
101	45.49	hareftoside E	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	[M-H] ⁻	927.495 3	927.498 3	3.23	777.428 3, 764.584 7, 678.328 6, 442.217 1
102	45.49	人参皂苷 Rb ₁	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	[M-H] ⁻	1 107.595 1	1 107.597 5	2.17	961.537 1, 799.488 8, 637.434 1, 475.379 6
103	45.62	地黄苷	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	651.228 9	651.231 4	3.84	562.208 1, 485.901 8, 329.235 4, 209.118 8
104	45.63	7-O-methylisomucronulatol	C ₁₈ H ₂₀ O ₅	[M-H] ⁻	315.123 2	315.124 4	3.81	297.114 1, 285.114 5, 211.134 5, 180.912 2, 112.984 7
105	45.68	芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 0	269.046 2	4.46	225.149 5, 165.978 6, 151.003 0, 119.049 2
106	45.69	wistariasonin B2	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	[M-H] ⁻	957.505 9	957.507 7	1.88	911.500 9, 764.678 4, 749.446 4, 667.407 3, 497.122 7
107	45.80	异丁香酚甲醚	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	[M-H] ⁻	177.091 6	177.091 5	-0.56	150.030 3, 135.044 5, 123.018 8
108	45.83	垂崖豆腐藤异黄烷酮	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	[M-H] ⁻	315.086 9	315.087 8	2.86	285.082 7, 161.023 7, 109.028 5

续表 1

峰号	tr/min	成分	化学式	母离子	相对分子质量(<i>m/z</i>)			主要碎片 (<i>m/z</i>)
					理论值	实测值	偏差($\times 10^{-6}$)	
109	45.84	山柰素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.039 9	285.040 8	3.16	268.038 0, 240.103 2, 147.044 5, 136.039 6
110	45.85	太子参环肽 B	C ₄₀ H ₅₈ N ₈ O ₈	[M-H] ⁻	777.429 9	777.431 5	2.06	759.422 8, 534.303 5, 203.082 3, 155.081 9
111	45.95	3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	[M-H] ⁻	299.091 9	299.093 0	3.68	284.033 1, 269.082 4, 253.123 7
112	45.96	癸二酸	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	[M-H] ⁻	201.112 7	201.112 9	0.99	157.101 4, 120.055 0, 71.049 0
113	45.99	异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	315.050 5	315.051 7	3.81	300.028 0, 161.023 7, 112.984 7
114	46.12	地黄苷 A	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₅	[M-H] ⁻	523.166 3	523.168 7	4.59	/
115	46.13	黄芪皂苷 III	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	783.453 1	783.451 1	-2.55	765.397 2, 618.319 2, 529.316 2, 432.262 6
116	46.30	太子参环肽 A	C ₃₇ H ₅₇ N ₇ O ₈	[M-H] ⁻	726.419 0	726.421 2	3.03	682.394 8, 529.315 1, 325.225 6
117	46.32	黄药子素 B	C ₁₉ H ₂₀ O ₆	[M-H] ⁻	343.118 2	343.119 2	2.91	301.035 6, 255.139 3, 93.000 2
118	46.35	桔皮素	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	[M-H] ⁻	371.113 1	371.114 1	2.69	326.176 8, 283.134 4, 86.023 6
119	46.35	pseudostellarin G	C ₄₂ H ₅₆ N ₈ O ₉	[M-H] ⁻	815.409 2	815.410 6	1.72	785.404 9, 682.394 5, 618.306 1, 317.162 2, 203.082 4
120	46.36	大豆皂苷 Bb	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	[M-H] ⁻	941.511 0	941.512 3	1.38	764.668 9, 615.394 9, 457.370 1, 205.071 6
121	46.44	黄芪皂苷 II	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	825.463 6	825.465 7	2.54	719.459 8, 617.406 7, 404.927 7
122	46.47	刺芒柄花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	267.065 7	267.066 5	3.00	252.043 1, 165.978 4, 96.958 9
123	46.51	茉莉酸	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	[M-H] ⁻	209.117 8	209.118 0	0.96	191.107 2, 163.112 3
124	46.56	樱花素	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M-H] ⁻	285.076 3	285.077 2	3.16	267.197 3, 179.034 2, 147.044 6, 136.039 6
125	46.56	大豆皂苷 II	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	[M-H] ⁻	911.500 4	911.502 0	1.76	893.494 6, 764.700 6, 615.393 4
126	46.58	山药素 III	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	[M-H] ⁻	243.102 1	243.102 7	2.47	223.134 3, 137.060 0, 122.036 1
127	46.72	苦楝苦素	C ₂₁ H ₂₈ O ₆	[M-H] ⁻	375.180 8	375.179 4	-3.73	284.973 9, 253.134 2, 185.117 9, 93.000 3
128	46.73	美迪紫檀素	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	[M-H] ⁻	269.081 4	269.082 3	3.34	254.058 9, 249.035 0, 223.113 0, 165.978 6
129	46.84	苦玄参苷 X	C ₃₆ H ₅₄ O ₁₁	[M-H] ⁻	661.358 8	661.360 4	2.42	/
130	46.89	brachyoside B	C ₃₆ H ₆₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	651.410 8	651.412 7	2.92	609.409 3, 395.520 1, 297.078 3, 131.034 5
131	47.07	薯蓣皂苷	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	867.474 2	867.476 0	2.07	779.463 8, 761.445 9, 617.406 9, 411.353 3
132	47.08	cyclounifolioside B	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	813.463 6	813.465 3	2.09	767.491 5, 459.385 8, 313.144 9
133	47.15	黄药子素 C	C ₁₉ H ₂₂ O ₇	[M-H] ⁻	361.128 7	361.130 0	3.60	343.155 3, 327.237 1, 225.007 7, 93.000 2
134	47.15	鸢尾黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	299.055 6	299.056 6	3.34	284.032 9, 210.955 3, 59.012 7
135	47.26	6-姜酚	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	[M-H] ⁻	293.175 3	293.176 3	3.41	236.105 5, 221.154 4, 71.012 6
136	47.32	1-脱氢-6-姜酮	C ₁₇ H ₂₂ O ₄	[M-H] ⁻	289.144 0	289.144 8	2.77	286.211 6, 243.175 5, 59.012 6
137	47.32	商陆素	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[M-H] ⁻	329.066 1	329.067 1	3.04	314.043 9, 287.166 3, 59.012 6
138	47.61	黄独素 G	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	[M-H] ⁻	345.133 8	345.134 9	3.19	315.160 5, 301.144 9, 229.160 1, 93.000 2
139	47.64	placunol B	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	[M-H] ⁻	355.118 2	355.118 9	1.97	267.139 5, 241.160 0, 223.149 2, 171.102 1, 93.000 1
140	47.72	山药素 V	C ₁₇ H ₂₀ O ₄	[M-H] ⁻	287.128 3	287.129 1	2.79	272.105 8, 219.102 7, 211.148 9, 59.012 6
141	48.02	异落叶松脂素	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	[M-H] ⁻	359.149 5	359.150 5	2.78	283.134 5, 270.126 8, 157.011 3, 93.000 2
142	48.03	山药素 I	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	[M-H] ⁻	283.097 0	283.098 0	3.53	251.107 8, 209.097 0, 87.007 6
143	48.55	愈创醇	C ₁₅ H ₂₆ O	[M-H] ⁻	221.190 5	221.190 8	1.36	193.086 1, 177.091 5, 149.096 3, 134.036 2
144	49.08	柳杉酚	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	[M-H] ⁻	299.201 1	299.201 8	2.34	282.994 7, 253.252 6, 227.107 4
145	49.68	丹参酚酮	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	[M-H] ⁻	313.180 4	313.181 3	2.87	298.157 9, 243.196 6
146	50.07	spinosic acid A	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	[M-H] ⁻	471.347 4	471.348 3	1.91	427.306 9, 385.280 2
147	50.21	甲基条叶蒽素	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	[M-H] ⁻	343.081 8	343.082 5	2.04	328.059 1, 299.093 9, 259.061 3, 231.066 3
148	51.97	丹参酮 IIa	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	[M-H] ⁻	293.117 8	293.118 6	2.73	185.117 6, 157.011 2, 89.023 3
149	52.98	熊果酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	[M-H] ⁻	455.352 5	455.353 5	2.20	408.276 7, 389.251 3, 317.291 0
150	53.58	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	279.232 4	279.233 2	2.86	261.222 1, 251.107 3, 236.208 0, 201.059 1

和 210502 的药品等质量混匀,用于方法学验证。

取混合 TJC 粉末制备的供试品溶液,按照“2.2.1”项下的色谱条件连续进样 6 次,以 11 号峰为参照峰(该色谱峰分离度较好,且有较大的峰面积),计算 25 个共有峰的相对保留时间以及相对峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.59%,相对峰面积的 RSD 均小于 3.34%,表明该方法精密性良好。

2.3.2 中间精密性考察 将批号为 210501、210502 和 220502 的药品等质量混匀,按照“2.1.2”项下方法,在不同时期,由 2 名实验人员分别平行制备 6 份供试品溶液,各自制备 TJC 供试品溶液,按照“2.2.1”项下的色谱条件进样,以 11 号峰为参照峰计算 25 个共有峰的相对保留时间以及相对峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.46%,相对峰面积的 RSD 均小于 4.89%,表明该方法中间精密性良好。

2.3.3 重复性考察 取“2.3.1”项所述混合 TJC 粉末,按照“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液。按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定,以 11 号峰为参照峰,计算 25 个共有峰的相对保留时间以及相对峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.16%,相对峰面积的 RSD 均小于 4.70%,表明该检测方法重复性良好。

2.3.4 稳定性考察 取“2.3.1”项所述混合 TJC 粉末,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,制备后样品置于 4℃ 冰箱。分别于制备后 0、2、4、6、

10、12 h,按照“2.2.1”项色谱条件进样测定,以 11 号峰为参照峰,计算 25 个共有峰的相对保留时间以及相对峰面积。结果显示,各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.74%,相对峰面积的 RSD 均小于 4.62%,表明 12 h 内供试品溶液的稳定性良好。

2.3.5 HPLC 指纹图谱的采集 取 15 个不同批次的 TJC,依照“2.1.2”项下方法分别制备 15 批 TJC 供试品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版本)》对所得 15 批样品的色谱图进行分析,以其中的 S1 图谱作为参照谱,采用多点校正后进行自动匹配(时间窗为 0.1 min),用中位数法生成指纹图谱以及对照图谱(图 2)。

2.3.6 共有峰的指认 根据指纹图谱结果,共标定 25 个色谱峰。通过与混合对照品(图 3)进行比对,分别指认了 8 个色谱峰,其中 6 号峰为原儿茶酸、9 号峰为原儿茶醛、11 号峰为葛根素、12 号峰为葛根素芹菜糖苷、13 号峰为 3'-甲氧基葛根素、15 号峰为大豆苷、18 号峰为丹酚酸 B、25 号峰为丹参酮 II_A。由于 11 号峰面积最大、分离度良好、出峰时间适中,故选择此峰为参照峰。

2.3.7 相似度评价 用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版本)》对所得 15 批 TJC 样品的指纹图谱以及其对照图谱进行相似度计算,结果见表 2。15 批次样品(S1~S15)的指纹图谱与对照图谱的相似度分别为 0.981、0.985、0.987、0.992、0.991、0.990、0.992、0.989、0.988、0.984、0.973、0.982、

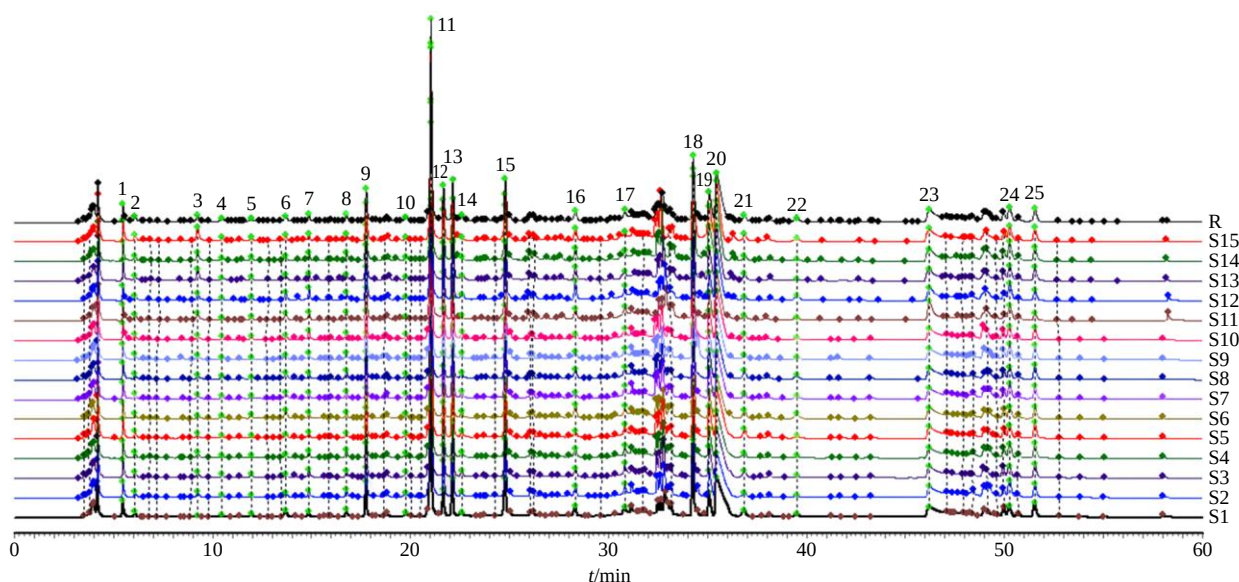


图 2 15 批 TJC 的指纹图谱 (S1~S15) 和对照图谱 (R)

Fig. 2 Fingerprints of 15 batches of TJC samples (S1—S15) and reference (R)

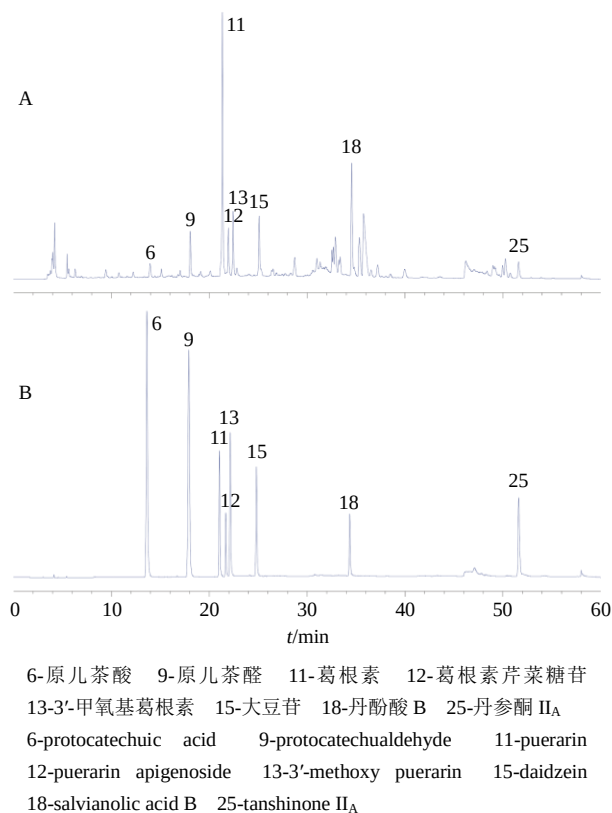


图 3 TJC (A) 与混合对照品溶液 (B) 的 HPLC 图 (检测波长 280 nm)

Fig. 3 HPLC of TJC (A) and mixed reference substances solution (B) (wavelength 280 nm)

0.990、0.987、0.979。结果显示, 15 批 TJC 与对照谱图的相似度均在 0.97 以上, 这表明 15 批次 TJC 之间的差异较小, 其质量的稳定性和均一性良好。

2.4 HPLC 测定 TJC 中 8 种指标成分的含量

2.4.1 线性关系考察 将一系列混合对照品溶液按照“2.2.1”项下的色谱条件依次进样, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 得到各成分的回归方程及线性范围, 结果见表 3。根据结果可知, 在较宽的质量浓度范围内, 所有校准曲线均表现出良好的线性 ($R^2 > 0.999$), 检测限和定量限分别在 0.287~1.001 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.869~3.034 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.2 精密度试验 取“2.3.1”项所述混合 TJC 粉末制备的供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 得 8 种指标成分原儿茶酸、原儿茶醛、葛根素、葛根素芹菜糖苷、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的保留时间以及含量, 计算其 RSD 分别为 0.46%、0.61%、0.39%、0.33%、0.32%、0.25%、0.07%、0.02% 和 1.09%、0.24%、0.31%、0.43%、1.48%、0.85%、0.36%、0.70%。由结果可知, 8 种化合物保留时间的 RSD 均小于 0.61%, 含量的 RSD 均小于 1.48%, 表明该方法进样精密度良好。

2.4.3 中间精密度考察 取“2.3.2”项所述混合 TJC

表 2 15 批次 TJC 相似度评价结果

Table 2 Similarities of 15 batches of TJC

样品	相似度															对照
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	
S1	1.000	0.977	0.969	0.964	0.960	0.977	0.979	0.974	0.964	0.974	0.949	0.963	0.962	0.954	0.959	0.981
S2	0.977	1.000	0.961	0.972	0.970	0.968	0.970	0.965	0.972	0.958	0.969	0.976	0.969	0.960	0.973	0.985
S3	0.969	0.961	1.000	0.990	0.990	0.977	0.987	0.990	0.985	0.990	0.933	0.953	0.972	0.964	0.956	0.987
S4	0.964	0.972	0.990	1.000	0.990	0.987	0.986	0.985	0.986	0.978	0.956	0.965	0.976	0.979	0.963	0.992
S5	0.960	0.970	0.990	0.990	1.000	0.978	0.981	0.983	0.986	0.977	0.954	0.966	0.984	0.977	0.967	0.991
S6	0.977	0.968	0.977	0.987	0.978	1.000	0.984	0.978	0.974	0.972	0.966	0.972	0.977	0.983	0.958	0.990
S7	0.979	0.970	0.987	0.986	0.981	0.984	1.000	0.995	0.987	0.991	0.949	0.961	0.978	0.971	0.961	0.992
S8	0.974	0.965	0.990	0.985	0.983	0.978	0.995	1.000	0.987	0.992	0.937	0.954	0.977	0.963	0.961	0.989
S9	0.964	0.972	0.985	0.986	0.986	0.974	0.987	0.987	1.000	0.982	0.944	0.953	0.975	0.963	0.961	0.988
S10	0.974	0.958	0.990	0.978	0.977	0.972	0.991	0.992	0.982	1.000	0.926	0.947	0.970	0.956	0.953	0.984
S11	0.949	0.969	0.933	0.956	0.954	0.966	0.949	0.937	0.944	0.926	1.000	0.987	0.965	0.980	0.957	0.973
S12	0.963	0.976	0.953	0.965	0.966	0.972	0.961	0.954	0.953	0.947	0.987	1.000	0.971	0.976	0.963	0.982
S13	0.962	0.969	0.972	0.976	0.984	0.977	0.978	0.977	0.975	0.970	0.965	0.971	1.000	0.984	0.979	0.990
S14	0.954	0.960	0.964	0.979	0.977	0.983	0.971	0.963	0.963	0.956	0.980	0.976	0.984	1.000	0.965	0.987
S15	0.959	0.973	0.956	0.963	0.967	0.958	0.961	0.961	0.961	0.953	0.957	0.963	0.979	0.965	1.000	0.979
对照	0.981	0.985	0.987	0.992	0.991	0.990	0.992	0.989	0.988	0.984	0.973	0.982	0.990	0.987	0.979	1.000

表 3 HPLC 测定 TJC 主要成分的标准曲线和范围

Table 3 Standard curves and ranges of main ingredients in TJC by HPLC determination

成分	回归方程	R ²	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	检测限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
原儿茶酸	$Y=19\,147\,X-1.462\,3$	0.999 0	0.010~0.080	0.892	2.704
原儿茶醛	$Y=60\,924\,X-125.3$	0.999 0	0.020~0.080	0.630	1.909
葛根素	$Y=21\,375\,X-99.586$	0.999 3	0.100~0.900	0.287	0.869
葛根素芹菜糖苷	$Y=15\,083\,X-58.878$	0.999 1	0.040~0.400	1.001	3.034
3'-甲氧基葛根素	$Y=21\,374\,X-26.105$	0.999 6	0.030~0.240	0.910	2.757
大豆苷	$Y=23\,127\,X-124.84$	0.999 5	0.015~0.240	0.440	1.333
丹酚酸 B	$Y=15\,166\,X-25.889$	0.999 1	0.100~0.800	0.329	0.996
丹参酮 II _A	$Y=32\,880\,X-79.7$	0.999 3	0.020~0.080	0.572	1.733

粉末,按照“2.1.2”项下方法,在不同时期,由 2 名实验人员分别平行制备 6 份供试品溶液,各自制备 TJC 供试品溶液,按照“2.2.1”项下的色谱条件进样,得 8 种指标成分原儿茶酸、原儿茶醛、葛根素、葛根素芹菜糖苷、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的保留时间及含量,计算其 RSD 值分别为 0.44%、0.48%、0.50%、0.63%、0.55%、0.72%、0.86%、0.35%和 1.90%、3.99%、3.43%、2.37%、3.93%、2.95%、2.86%、1.28%。由结果可知,8 种指标成分保留时间的 RSD 均小于 0.86%,含量的 RSD 均小于 3.99%,表明该方法中间精密度良好。

2.4.4 重复性考察 取“2.3.1”项所述混合 TJC 粉末适量,按照“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件依次进样,得 8 种指标成分原儿茶酸、原儿茶醛、葛根素、葛根素芹菜糖苷、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的保留时间以及含量,计算其 RSD 值分别为 0.07%、0.05%、0.07%、0.05%、0.04%、0.04%、0.05%、0.01%和 2.28%、2.47%、2.38%、4.50%、2.39%、2.31%、2.43%、1.57%。由结果可知,8 种指标成分保留时间的 RSD 均小于 0.07%,含量的 RSD 均小于 4.50%,表明该方法重复性良好。

2.4.5 稳定性考察 取“2.3.1”项所述混合 TJC 粉末,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,制备后样品置于 4℃ 冰箱。分别于制备后 0、2、4、6、10、12 h,按照“2.2.1”项色谱条件进样,得 8 种指标成分原儿茶酸、原儿茶醛、葛根素、葛根素芹菜糖苷、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的保留时间及含量,计算其 RSD 值分别为 0.66%、0.36%、0.33%、0.27%、0.24%、0.29%、0.16%、0.02%和 4.46%、0.51%、0.17%、4.50%、1.97%、

0.54%、0.60%、0.35%。结果显示,8 种指标成分保留时间的 RSD 均小于 0.66%,含量的 RSD 均小于 4.50%,表明 12 h 内供试品溶液的稳定性良好。

2.4.6 加样回收率考察 取“2.3.1”项所述混合已知含量(原儿茶酸 0.560 mg/g,原儿茶醛 0.474 mg/g,葛根素 7.210 mg/g,葛根素芹菜糖苷 1.756 mg/g,3'-甲氧基葛根素 1.860 mg/g,大豆苷 1.778 mg/g,丹酚酸 B 4.582 mg/g,丹参酮 II_A 0.496 mg/g)的 TJC 粉末,分别称取 9 份,每份约 0.05 g,随机分成 3 组。采用标准添加法进行加样回收试验,每组样品中分别加入用 70%甲醇水溶液配制的相当于原药中 8 种指标成分含量的 80%、100%、120%的混合对照品溶液 1 mL,密塞称定质量。50℃ 超声提取 2 次,每次 30 min,用 70%甲醇补足减失的质量,摇匀,在 4℃ 下以 13 800×g 离心 10 min,离心 3 次,合并上清液,按照“2.2.1”项下色谱条件进样检测,记录 8 种指标成分的峰面积。根据标准曲线进行定量,最终质量浓度均在线性范围内。结果原儿茶酸、原儿茶醛、葛根素、葛根素芹菜糖苷、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 的平均回收率分别为 96.44%、98.39%、95.30%、102.15%、101.30%、103.56%、97.28%、96.19%,计算其 RSD 值分别为 2.44%、4.12%、1.48%、4.15%、2.17%、3.92%、3.10%、4.43%。8 种指标成分的平均回收率均在 95.30%~103.56%,且 RSD 均小于 4.43%,该方法的准确性良好。

2.4.7 含量测定 按照“2.1.2”项下方法制备 15 批不同批次(S1~S15)的 TJC 供试品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件进行检测,各批次重复进样 3 次。记录 8 种指标成分的峰面积,并根据标准曲线计算其含量,结果见表 4。8 种指标成分中,葛根素、

表 4 15 批次 TJC 中 8 种指标成分含量测定结果 ($n = 3$)Table 4 Content determination results of eight components of 15 batches of TJC ($n = 3$)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
	原儿茶酸	原儿茶醛	葛根素	3'-甲氧基葛根素	葛根素芹菜糖苷	大豆苷	丹酚酸 B	丹参酮 II _A
200803	0.371	0.464	5.374	1.392	1.327	1.531	4.726	0.560
200502	0.255	0.408	6.904	1.407	1.931	1.659	3.187	0.526
201002	0.204	0.442	5.902	1.608	1.663	1.542	3.570	0.519
210302	0.224	0.400	6.451	1.296	1.826	1.653	3.065	0.555
190301	0.233	0.415	7.037	1.692	1.876	1.577	3.523	0.594
210902	0.482	0.389	6.368	1.505	1.685	1.546	4.149	0.452
210502	0.325	0.488	6.154	1.516	1.715	1.892	4.168	0.482
210603	0.367	0.365	5.632	1.161	1.423	1.591	3.226	0.514
210401	0.267	0.345	5.720	1.148	1.671	1.540	3.507	0.548
210501	0.222	0.359	5.728	1.469	1.597	1.378	3.934	0.470
220502	0.381	0.451	8.119	1.556	2.102	1.978	3.971	0.466
220103	0.453	0.478	7.198	2.075	2.111	1.732	3.377	0.412
220701	0.322	0.492	7.148	1.439	1.915	1.603	3.462	0.531
220601	0.293	0.491	8.805	1.626	2.204	2.276	4.918	0.558
220702	0.289	0.516	7.745	1.540	1.985	1.917	3.293	0.558
RSD/%	27.09	12.63	14.98	15.01	13.94	13.58	14.94	9.69

丹酚酸 B 等含量较高且稳定,不同批次间含量差异较小。原儿茶酸的含量最低且不稳定,不同批次间含量差异较大。

3 讨论

3.1 色谱条件的考察及提取方法的优化

3.1.1 色谱柱的优选 考察了 Capcell Pak C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 3 μm)、Capcell Pak ADME (150 mm×4.6 mm, 3 μm)、Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 2.7 μm) 3 种不同型号的色谱柱,结果显示,经 Capcell Pak C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 3 μm) 色谱柱分离后,各色谱峰的分离效果最好,峰形尖锐,柱效最高,故选用 Capcell Pak C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 3 μm) 色谱柱进行本实验。

3.1.2 流动相条件的优选 分别考察了 0.1%甲酸水溶液-乙腈、0.5%甲酸水溶液-乙腈、0.5%甲酸水溶液-0.5%甲酸乙腈溶液、0.1%甲酸水溶液-0.1%甲酸乙腈溶液等流动相体系。最终结果显示,使用 0.5%甲酸水溶液-0.5%甲酸乙腈溶液作为流动相时,洗脱效果最好,出峰情况良好,色谱峰的分离度较高,故选择 0.5%甲酸水溶液-0.5%甲酸乙腈溶液作为实验最终的流动相。

3.1.3 柱温的优选 分别考察了 30、35、40 ℃柱温条件下色谱峰的分离情况,结果显示在 40 ℃条

件下峰形最好,基线平稳,噪音较低,因此,选择 40 ℃为最终柱温。

3.1.4 提取方法的优化 对 TJC 提取工艺中的提取溶剂进行优化。考察了纯甲醇、50%甲醇、70%甲醇和纯水作为提取溶剂时,对 TJC 中主要成分提取效率的影响。结果显示,70%甲醇作为提取溶剂时提取率最高,且基线平稳、出峰多、响应值相对较高,故最终选用 70%甲醇作为提取溶剂。

3.2 综合分析

本研究利用 HPLC-Q-Exactive MS 对 TJC 进行全局定性分析,采用 Full MS/dd-MS² 检测模式结合数据库分析筛查、对照品比对、人工解析等方法,鉴定出 TJC 中 150 种化合物,为后续 TJC 药效研究提供了物质基础。同时,本实验建立了 TJC 的 HPLC 指纹图谱,并对其中 8 种特征性指标成分(原儿茶醛、原儿茶酸、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A)进行定量分析,结果显示,葛根中的葛根素以及丹参中的丹酚酸 B 的含量相对较高且均高于现行质量标准所述小檗碱,可作为 TJC 中的质量标志物,为 TJC 的多指标质量控制提供参考依据。

《本草纲目》中记载:“葛根,性甘、辛、平、无毒,主治:消渴、身大热、呕吐、诸弊,起阴气,

解诸毒”，葛根具有降血糖、延缓衰老、调节血脂、促进造血功能等方面的作用，并应用于临床。葛根提取物能有效降低 I 型糖尿病小鼠的空腹血糖值并减缓因糖尿病产生的体质量下降情况^[17-18]。葛根素可通过降血糖、调血脂、保护血管、抗氧化应激、减轻炎症反应和改善胰岛素抵抗等机制来防治糖尿病，并且可以改善微血管、大血管及神经系统并发症的发生发展^[19]。丹参-葛根药对能有效降低 II 型糖尿病大鼠的空腹血糖、血脂水平及肝肾功能指标，有效改善肾脏、胰脏病变^[20]。结合上述研究结果，我们推断 TJC 治疗糖尿病的药效作用可能与其中的葛根素、丹酚酸 B 等化学成分有关。

通过上述研究，共鉴定 TJC 中 150 种化合物，主要包括有机酸类、黄酮类、糖苷类、环烯醚萜类以及糖类等；在 TJC 指纹图谱中共标定 25 个共有峰，比较 15 批次样品，发现其相似度在 0.97 以上；建立的 HPLC 定量方法稳定可靠，对 8 种主要成分（原儿茶醛、原儿茶酸、葛根素、3'-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A）进行了定量分析。

综上，TJC 主要含有机酸类、黄酮类等活性成分，其生产工艺稳定，质量可控。葛根素、丹酚酸 B、3'-甲氧基葛根素等化合物含量较高且稳定，可作为 TJC 的主要质量标志物。同时，本研究建立的中成药成分定性、定量分析及指纹图谱建立方法可为中药复方研究和质量控制提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 国家食品药品监督管理局国家药品标准: WS-11213(ZD-1213)-2002-2012Z [S]. 2002.
- [2] 依丽米热·努尔麦麦提, 赵红梅, 热依汗尼沙·亚克亚. 通脉降糖胶囊联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(8): 2416-2419.
- [3] 李翎熙, 陈迪路, 周小江. 玄参化学成分、药理活性研究进展及其质量标志物分析预测 [J]. 中成药, 2020, 42(9): 2417-2426.
- [4] 陈向阳, 翟硕, 徐露露, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS 法结合特征裂解途径分析玄参水提物中化学成分 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2822-2829.
- [5] 张瑞华, 张静文, 刘玲, 等. 黄芪及其有效组分药理作用与临床应用现状 [J]. 陕西中医, 2021, 42(8): 1138-1141.
- [6] Yin F, Zhou H F, Fang Y C, et al. Astragaloside IV alleviates ischemia reperfusion-induced apoptosis by inhibiting the activation of key factors in death receptor pathway and mitochondrial pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 248: 112319.
- [7] 盖晓红, 刘素香, 任涛, 等. 黄连的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4919-4927.
- [8] 邓爱平, 李颖, 吴志涛, 等. 苍术化学成分和药理的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 3904-3913.
- [9] 傅兴圣, 刘训红, 许虎, 等. 太子参研究现状与研发趋势 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(7): 757-760.
- [10] Huang Y, Yang J H, Zhao Y, et al. Screening, optimization, and bioavailability research of natural deep eutectic solvent extracts from *Radix Pueraria* [J]. Molecules, 2021, 26(3): 729.
- [11] 杨洪雁, 杜智恒, 白秀娟. 水蛭药理作用的研究进展 [J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(3): 6.
- [12] 杨文强, 于炎冰, 徐晓利, 等. 通脉降糖胶囊对糖尿病性大鼠周围神经病变的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(7): 831-834.
- [13] 安先勇, 肖柏春. 通脉降糖胶囊对 2 型糖尿病并脑梗死恢复期患者预后的影响 [J]. 解放军医药杂志, 2018, 30(4): 83-87.
- [14] 张爱旗, 王会芳, 李志茹. 通脉降糖胶囊治疗糖尿病周围神经病变临床观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(10): 1077.
- [15] 徐静, 陈朋. 通脉降糖胶囊治疗糖尿病神经病变疗效分析 [J]. 中医药临床杂志, 2013, 25(4): 313-314.
- [16] 张斌, 张黎, 于炎冰, 等. 通脉降糖胶囊对 AGEs 诱导的雪旺细胞凋亡的影响及机制 [J]. 中华神经医学杂志, 2015, 14(11): 1089-1094.
- [17] Prasain J K, Peng N, Rajbhandari R, et al. The Chinese *Pueraria* root extract (*Pueraria lobata*) ameliorates impaired glucose and lipid metabolism in obese mice [J]. Phytomedicine, 2012, 20(1): 17-23.
- [18] Wong K H, Li G Q, Li K M, et al. Kudzu root: Traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3): 584-607.
- [19] 曹盼, 张樱山, 魏学明, 等. 葛根素药理作用研究新进展 [J]. 中成药, 2021, 43(8): 2130-2134.
- [20] 张娜, 李雪嘉, 江晓红, 等. 丹参葛根药对治疗 2 型糖尿病的药效学研究 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(6): 797-802.

[责任编辑 郑礼胜]