

## 黄芪桂枝五物汤基准样品 UPLC 指纹图谱建立及质量标志物 (Q-Marker) 定量测定

林 川<sup>1</sup>, 韩 迪<sup>1</sup>, 王姗姗<sup>1</sup>, 唐嵩媛<sup>1</sup>, 孙 晖<sup>1\*</sup>, 闫广利<sup>1</sup>, 张喜武<sup>1</sup>, 孔 玲<sup>1</sup>, 韩 莹<sup>1</sup>, 车延柠<sup>2</sup>, 王喜军<sup>1\*</sup>

1. 黑龙江中医药大学, 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 国家中医药管理局中医方证代谢组学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150040
2. 哈尔滨中药四厂有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150500

**摘要:** 目的 建立黄芪桂枝五物汤 (Huangqi Guizhi Wuwu Decoction, HGWD) 基准样品 UPLC 指纹图谱及质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 含量测定方法, 对 15 批 HGWD 基准样品进行质量评价, 为后续复方制剂开发提供质量控制方法和评价体系。方法 制备 HGWD 基准样品, 采用 Waters Acquity™ T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 以乙腈-0.15% 磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 柱温 30 °C; 检测波长: 0~18.5 min, 230 nm; 18.5~24.5 min, 260 nm; 24.5~40.0 min, 280 nm; 体积流量 0.3 mL/min; 进样体积 1 μL; 进行指纹图谱方法学考察, 采集 15 批 HGWD 基准样品的 UPLC 指纹图谱, 将数据结果导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版), 对 15 批 HGWD 基准样品指纹图谱进行相似度评价, 对共有峰进行归属和聚类热图分析; 同时测定 15 批基准样品中 Q-Marker (毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芍药苷、肉桂酸、6-姜酚) 的含量。结果 HGWD 基准样品 UPLC 指纹图谱方法学验证良好, 建立了 15 批 HGWD 基准样品的 UPLC 指纹图谱, 与对照指纹图谱比较相似度均大于 0.9。确定 24 个共有峰, 经与混合对照品比对, 指认出 8 个色谱峰, 分别为 8 号峰氧化芍药苷、10 号峰芍药苷、12 号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷、14 号峰香豆素、18 号峰肉桂酸、19 号峰肉桂醛、20 号峰槲皮素、24 号峰 6-姜酚。测定 15 批 HGWD 基准样品中 4 个 Q-Marker 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷、6-姜酚的质量分数分别为 115.49~494.96、254.68~760.79、3 106.72~6 049.40、232.61~704.10 μg/g, 出膏率为 11.63%~14.14%, 饮片-汤液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷及 6-姜酚的转移率分别 8.23%~19.66%、23.52%~41.21%、29.15%~41.23%、14.58%~30.07%; 汤液-基准样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷及 6-姜酚的转移率分别 86.35%~97.67%、90.34%~98.13%、91.51%~98.88%、93.53%~98.29%。结论 建立的 HGWD 基准样品 UPLC 指纹图谱和 Q-Marker 含量测定分析方法准确、可靠, 可用于黄芪桂枝汤五物汤基准样品的质量评价, 作为后续制剂开发和质量控制依据。

**关键词:** 黄芪桂枝五物汤; 基准样品; UPLC; 指纹图谱; 质量标志物; 氧化芍药苷; 芍药苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 香豆素; 肉桂酸; 肉桂醛; 槲皮素; 6-姜酚

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)12-4238-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.12.008

## Establishment of UPLC fingerprint and determination of quality markers of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction benchmark samples

LIN Chuan<sup>1</sup>, HAN Di<sup>1</sup>, WANG Shanshan<sup>1</sup>, TANG Songyuan<sup>1</sup>, SUN Hui<sup>1</sup>, YAN Guangli<sup>1</sup>, ZHANG Xiwu<sup>1</sup>, KONG Ling<sup>1</sup>, HAN Ying<sup>1</sup>, CHE Yanning<sup>2</sup>, WANG Xijun<sup>1</sup>

1. National Key Laboratory of Fusion and Innovation of Traditional Chinese Medicine and Modern Traditional Chinese Medicine, Metabolomics Research Center of Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China
2. Harbin No. 4 TCM Factory Co., Ltd., Harbin 150500, China

收稿日期: 2025-01-31

基金项目: 黑龙江省重点研发计划指导类项目 (GZ20210125); 哈尔滨中药四厂横向课题 (HX2019051)

作者简介: 林 川, 硕士研究生, 主要从事中药药效物质基础与质量控制研究。E-mail: 15983955737@163.com

\*通信作者: 王喜军, 教授, 博士生导师, 主要从事中药血清药物化学及中医方证代谢组学研究。E-mail: xijunw@sina.com  
孙 晖, 教授, 博士生导师, 从事中药体内直接作用物质及中药质量标准研究。E-mail: sunhui7045@163.com

**Abstract: Objective** To establish UPLC fingerprint and determination method for quality markers of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction (HGWD, 黄芪桂枝五物汤) benchmark samples and evaluate the quality of 15 batches of HGWD, so as to provide quality control method and evaluation system for the subsequent development of compound preparation. **Methods** The benchmark samples of HGWD were prepared by Waters Acquity™ T3 column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm). Acetonitrile-0.15% phosphoric acid aqueous solution was used as mobile phase with gradient elution. Column temperature: 30 °C; Detection wavelength: 0—18 min, 230 nm; 18.5—24.5 min, 260 nm; 24.5—40 min, 280 nm; Elution rate: 0.3 mL/min; Injection volume: 1 μL; The fingerprint methodology was investigated, 15 batches of UPLC fingerprints of HGWD benchmark samples were collected, and the data results were imported into the “TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System” (2012 edition). The similarity evaluation was carried out on the fingerprint of 15 batches of benchmark samples of HGWD, and the common peaks were attributed and cluster analyzed. At the same time, the contents of quality markers (calycosin-7-glucoside, paeoniflorin, cinnamic acid, 6-gingerol) in 15 batches of benchmark samples were determined. **Results** The methodological verification of the UPLC fingerprint of the HGWD benchmark samples was good. The UPLC fingerprints of 15 batches of the benchmark samples of HGWD were well verified. The similarity between the UPLC fingerprints and the control fingerprints was greater than 0.9. A total of 24 common peaks were identified, and eight chromatographic peaks were identified by comparing with mixed controls, namely peak 8 oxypaeoniflorin, peak 10 paeoniflorin, peak 12 calycosin-7-glucoside, peak 14 coumarin, peak 18 cinnamic acid, peak 19 cinnamaldehyde, peak 20 quercetin and peak 24 6-zingerol. The mass fractions of four quality markers, including calycosin-7-glucoside, cinnamic acid, paeoniflorin and 6-gingerol, in 15 batches of HGWD were determined to be 115.49—494.96, 254.68—760.79, 3 106.72—6 049.40, 232.61—704.10 μg/g, respectively. The paste extraction rate was 11.63%—14.14%, and the transfer rates of calycosin-7-glucoside, cinnamic acid, paeoniflorin and 6-gingerol in the decoction pieces-soup liquid were 8.23%—19.66%, 23.52%—41.21%, 29.15%—41.23% and 14.58%—30.07%, respectively. The transfer rates of calycosin-7-glucoside, cinnamic acid, paeoniflorin and 6-gingerol in the benchmark samples were 86.35%—97.67%, 90.34%—98.13%, 91.51%—98.88% and 93.53%—98.29%, respectively. **Conclusion** The established method of UPLC fingerprint and quality marker content determination of HGWD is accurate and reliable, which can be used for the quality evaluation of HGWD benchmark samples and could be used as the basis for the development and quality control of subsequent preparations.

**Key words:** Huangqi Guizhi Wuwu Decoction; benchmark samples; UPLC; fingerprints; quality marker; oxypaeoniflorin; paeoniflorin; calycosin-7-glucoside; coumarin; cinnamic acid; cinnamaldehyde; quercetin; 6-zingerol

黄芪桂枝五物汤 (Huangqi Guizhi Wuwu decoction, HGWD) 始载于汉代张仲景的《金匮要略》, 在 2021 年被国家中医药管理局、国家药品监督管理局收录《古代经典名方目录 (第一批)》百首古代经典名方之一<sup>[1]</sup>。始书记载: “血痹, 阴阳俱微, 寸口关上微, 外证身体不仁, 如风痹状, HGWD 主之”<sup>[2]</sup>。HGWD 为温里剂, 具有益气温经、血通痹之功效, 为治血痹症之要方, 由黄芪、桂枝、白芍、生姜和大枣共 5 味中药材组成。现代临床应用研究表明, HGWD 可用于治疗糖尿病周围神经病变<sup>[3-4]</sup>、缺血性中风、类风湿关节炎、脑梗死等多种疾病<sup>[5-7]</sup>。

目前, 对于该方剂研究多是临床疗效和作用机制方面, 在相关基准物质研究方面颇少且无完整质量评价体系, 因此本实验采用 UPLC 对 HGWD 进行指纹图谱建立和质量标志物 (quality markers, Q-Marker) 含量测定, 以健全该方剂的质量评价体系。与先前不同的是, 选用 UPLC 进行相关图谱研究, 比 HPLC 更具有高灵敏性、高检测能力以及强分离度<sup>[8-11]</sup>, 能够全面覆盖和清晰得到复方特征指纹峰, 更加应对中药复方的成分复杂性、不稳定性; 在含

量测定中, 选择能够体现 HGWD 功能属性相关的 Q-Marker (毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芍药苷、肉桂酸、6-姜酚) 进行测定, 保证复方在药材检查、制备工艺、基准样品提取等不同阶段的质量追溯和传递<sup>[12-13]</sup>, 并且也能充分监测和反映出中药复方的有效成分在加工过程对质量的影响。

对 HGWD 建立 UPLC 指纹图谱, 并采集 15 批样品的指纹图谱, 将 24 个共有峰面积导入数据处理系统, 进行聚类热图分析, 根据共有峰归属结果, 找到方剂中不同药味的成分 (色谱峰) 对不同批次之间质量差异的影响; 同时, 对 Q-Marker 进行含量测定、计算基准样品出膏率和评价饮片到水煎液 (汤液)、水煎液 (汤液) 到基准样品 (冻干粉) 量值传递, 从而建立起 HGWD 质量控制的关键策略, 能够准确、有效地反映出 Q-Marker 含量信息, 为其质量评价、临床应用以及相关复方制剂开发提供关键信息数据参考。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

H22-X1 型电砂锅, 杭州九阳生活电器有限公

司; Waters Acquity™ UPLC 液相色谱仪、Waters Acquity DAD 检测器, 美国沃特世公司; Unique-R202 型多功能超纯水系统, 厦门锐思捷水纯化技术有限公司; PB1501-N 型电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; KQ-250DB 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Sorvall ST-16R 型高速低温离心机, 美国赛默飞世尔科技有限公司; Modulyod 型冷冻干燥机, 美国 Thermo 公司。

## 1.2 材料

**1.2.1 药品与试剂** 对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 RFS-M02001902019, 质量分数≥96.9%)、香豆素(批号 H-016-170616, 质量分数≥98.0%), 均购置于成都瑞芬思生物科技有限公司; 对照品氧化芍药苷(批号 201807, 质量分数≥98.0%)、槲皮素(批号 201608, 质量分数≥98.0%)、肉桂酸(批号 110786-201604, 质量分数≥98.0%)、桂皮醛(批号

110710-202022, 质量分数≥98.0%)、芍药苷(批号 110736-202145, 质量分数≥96.7%)、6-姜酚(批号 111833-202007, 质量分数≥99.0%), 均购置于中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈, 质谱级, 美国 Fisher 公司; 磷酸, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 分析级甲醇, 天津市富宇精细化工有限公司。

**1.2.2 药材** 制备 HGWD 所用的药材黄芪、桂枝、白芍、生姜、大枣均购自道地产地或主产区, 由哈尔滨中药四厂有限公司提供, 各药材饮片均符合《中国药典》2020 年版一部有关规定, 产地及批号信息详见表 1。均经黑龙江中医药大学王喜军教授鉴定, 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; 桂枝为樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝; 白芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根;

表 1 HGWD 药材产地信息

Table 1 Origin information of HGWD compatibility medicinal materials

编号	黄芪		桂枝		白芍		生姜		大枣	
	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地
S1	YC001-180401	甘肃岷县	YC076-180501	广东省德清县	YC067-180401	安徽省亳州市	YC159-180501	山东省莱芜市	YC155-180301	山西省临县
S2	YC001-180402	甘肃岷县	YC076-180502	广东省罗定市	YC067-180402	安徽省亳州市	YC159-180502	山东省莱芜市	YC155-180302	山西省临县
S3	YC001-180403	甘肃岷县	YC076-180503	广东省罗定市	YC067-180403	安徽省亳州市	YC159-180503	山东省莱芜市	YC155-180303	山西省临县
S4	YC001-180404	甘肃岷县	YC076-180504	广西容县	YC067-180601	四川省中江县	YC159-180504	山东省莱芜市	YC155-180401	河北省沧州市
S5	YC001-180405	甘肃岷县	YC076-180505	广西容县	YC067-180602	四川省中江县	YC159-180505	山东省莱芜市	YC155-180402	山东省乐陵市
S6	YC001-180406	甘肃岷县	YC076-180506	广西岑溪市	YC067-180603	四川省中江县	YC159-180506	山东省昌邑市	YC155-180403	山东省乐陵市
S7	YC001-180501	内蒙古赤峰	YC076-180507	广西容县	YC067-180604	四川省中江县	YC159-180507	山东省昌邑市	YC155-180404	山东省乐陵市
S8	YC001-180502	内蒙古赤峰	YC076-180508	广西容县	YC067-180605	浙江省东阳市	YC159-180508	山东省昌邑市	YC155-180405	山东省乐陵市
S9	YC001-180503	内蒙古赤峰	YC076-180509	广西容县	YC067-180606	浙江省东阳市	YC159-180509	山东省昌邑市	YC155-180501	山西省临县
S10	YC001-180504	内蒙古乌兰察布市	YC076-180510	广西容县	YC067-180607	浙江省东阳市	YC159-180510	山东省昌邑市	YC155-180502	山西省临县
S11	YC001-180505	内蒙古乌兰察布市	YC076-180511	广西平南县	YC067-180608	浙江省东阳市	YC159-180511	四川省德阳市中江县	YC155-180503	山西省临县
S12	YC001-180506	内蒙古乌兰察布市	YC076-180512	广西平南县	YC067-180609	浙江省东阳市	YC159-180512	四川省德阳市中江县	YC155-180601	河北省石家庄市
S13	YC001-180507	内蒙古包头市	YC076-180513	广东省肇庆市	YC067-180610	安徽省亳州市	YC159-180513	四川省德阳市中江县	YC155-180602	河北省石家庄市
S14	YC001-180508	内蒙古包头市	YC076-180514	广东省肇庆市	YC067-180611	安徽省亳州市	YC159-180514	四川省德阳市中江县	YC155-180603	河北省石家庄市
S15	YC001-180509	内蒙古包头市	YC076-180515	广东省肇庆市	YC067-180612	安徽省亳州市	YC159-180515	四川省德阳市中江县	YC155-180604	山西省临县

生姜为姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎; 大枣为鼠李科枣属植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实。

根据国家中医药管理局公布的 HGWD 关键信息, 黄芪、桂枝、白芍、大枣饮片炮制规范参考《中国药典》2020 年版, 分别炮制成黄芪、桂枝、白芍、大枣饮片; 方剂中生姜以生品为用, 取生姜药材, 除去杂质、洗净、切片, 备用。经检验, 各单味药材、饮片均符合《中国药典》2020 年版要求。

## 2 方法与结果

### 2.1 HGWD 基准样品(冻干粉)的制备

HGWD 的制法: 参考国家中医药管理局、国家药品监督管理局联合颁布《古代经典名方关键信息表(16 首方剂)》中的规定<sup>[1]</sup>, 指出现代临床应用、实验研究参考古方《金匱要略》处方规定和用量。HGWD 经典名方最早源自东汉张仲景《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治第六》, 原文记载:“黄芪三两、桂枝三两、芍药三两, 生姜六两, 大枣十二枚,

右五味，水六升，煮取二升，温服七合，日三服”<sup>[2]</sup>。根据国家已经公布的关键信息，得HGWD处方组成和用量为黄芪饮片41.4 g、桂枝饮片41.4 g、白芍饮片41.4 g、生姜药材82.8 g、大枣饮片36 g，煎煮用水量1 200 mL，煮至400 mL。

综上，HGWD基准样品制备工艺为取日剂量黄芪饮片、桂枝饮片、白芍饮片各41.4 g、生姜药材82.8 g、大枣饮片36 g，置于电砂锅中，加水1 200

mL，浸泡60 min，电砂锅以2 200 W的功率煎煮10 min至沸腾后，将功率调至600 W保持微沸状态，并开始计时。煎煮60 min后，停止加热，药液趁热用100目滤布滤过，得到约400 mL的药液。冷冻干燥后，得到棕黄色鳞片状粉末，即HGWD基准样品（冻干粉）。15批次基准样品组合由各单味药材的对应饮片采用随机数表法组合后制得，具体饮片组合信息见表2。

表2 15批HGWD基准样品随机组合信息

Table 2 Random combination information of 15 batches of HGWD benchmark samples

编号	批号					编号	批号				
	黄芪	桂枝	白芍	生姜	大枣		黄芪	桂枝	白芍	生姜	大枣
HGWD-1	JL001-180502	JL076-180615	JL067-180601	YC159-180501	JL202-180607	HGWD-9	JL001-180502	JL076-180612	JL067-180607	YC159-180512	JL202-180609
HGWD-2	JL001-180502	JL076-180606	JL067-180402	YC159-180502	JL202-180402	HGWD-10	JL001-180604	JL076-180601	JL067-180611	YC159-180513	JL202-180603
HGWD-3	JL001-180609	JL076-180603	JL067-180403	YC159-180504	JL202-180403	HGWD-11	JL001-180608	JL076-180605	JL067-180612	YC159-180502	JL202-180610
HGWD-4	JL001-180505	JL076-180607	JL067-180606	YC159-180503	JL202-180401	HGWD-12	JL001-180607	JL076-180611	JL067-180604	YC159-180515	JL202-180613
HGWD-5	JL001-180606	JL076-180602	JL067-180401	YC159-180509	JL202-180402	HGWD-13	JL001-180606	JL076-180613	JL067-180610	YC159-180513	JL202-180610
HGWD-6	JL001-180605	JL076-180609	JL067-180603	YC159-180510	JL202-180607	HGWD-14	JL001-180505	JL076-180610	JL067-180602	YC159-180514	JL202-180608
HGWD-7	JL001-180501	JL001-180501	JL067-180608	YC159-180508	JL202-180602	HGWD-15	JL001-180503	JL076-180614	JL067-180403	YC159-180506	JL202-180612
HGWD-8	JL001-180504	JL076-180608	JL067-180610	YC159-180511	JL202-180605						

## 2.2 指纹图谱研究

### 2.2.1 供试品溶液制备

(1) HGWD基准样品供试品溶液：取HGWD基准样品约0.50 g，精密称定，置具塞锥形瓶中；精密加入75%甲醇20 mL，密塞，称定质量，超声处理（功率250 W、频率40 kHz）30 min，放冷，再称定质量，用75%甲醇补足减失的质量，4 000 r/min离心（4℃、10 min），取上清液，过0.22 μm微孔滤膜，摇匀，取续滤液，即得。

(2) 阴性对照液及各单味中药对照液：按照“2.1”项下HGWD基准样品的制备方法，同法制得缺黄芪、桂枝、白芍、生姜、大枣的5个阴性HGWD冻干粉样品和各单味中药冻干粉样品。按照“2.2.1 (1)”项下制备方法分别制备缺黄芪、桂枝、白芍、生姜、大枣阴性对照液及各单味中药对照液。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、香豆素、氧化芍药苷、槲皮素、肉桂酸、桂皮醛、芍药苷、6-姜酚对照品粉末适量，加甲醇溶解后，制得含毛蕊异黄酮葡萄糖苷、香豆素、氧化芍药苷、槲皮素、肉桂酸、桂皮醛、芍药苷、6-姜酚各质量浓度分别为0.475、0.350、0.525、0.267、0.310、0.473、2.197、0.552 mg/mL的对照品母液；分别精密吸取上述对照品母液适量，加甲醇溶解

后，制得含毛蕊异黄酮葡萄糖苷、香豆素、氧化芍药苷、槲皮素、肉桂酸、桂皮醛、芍药苷、6-姜酚各质量浓度分别为17.075、15.320、18.550、29.368、27.850、8.264、466.568、11.460 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为Acquity UPLC HSS T3（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；流动相为乙腈-0.15%磷酸水溶液；线性梯度洗脱：0~5.5 min，2.0%~3.0%乙腈；5.5~9.5 min，3.0%~9.0%乙腈；9.5~15.0 min，9.0%~13.0%乙腈；15.0~18.0 min，13.0%乙腈；18.0~18.5 min，13.0%~14.0%乙腈；18.5~24.5 min，14.0%~18.0%乙腈；24.5~32.0 min，18.0%~25.0%乙腈；32.0~40.0 min，25.0%~53.5%乙腈；柱温30℃；检测波长：230 nm（0~18.5 min，检查芍药苷、氧化芍药苷）、260 nm（18.5~24.5 min，检测香豆素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷）、280 nm（24.5~40.0 min，检测肉桂酸，肉桂醛、香豆素、6-姜酚）；体积流量0.3 mL/min；进样体积1 μL。

2.2.4 精密度试验 取HGWD基准样品（S1），按照“2.2.1 (1)”项下制备方法制备供试品溶液，按照“2.2.3”项下色谱条件连续进样6次，分别采集UPLC指纹图谱，以10号峰芍药苷为参照峰（S），计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的

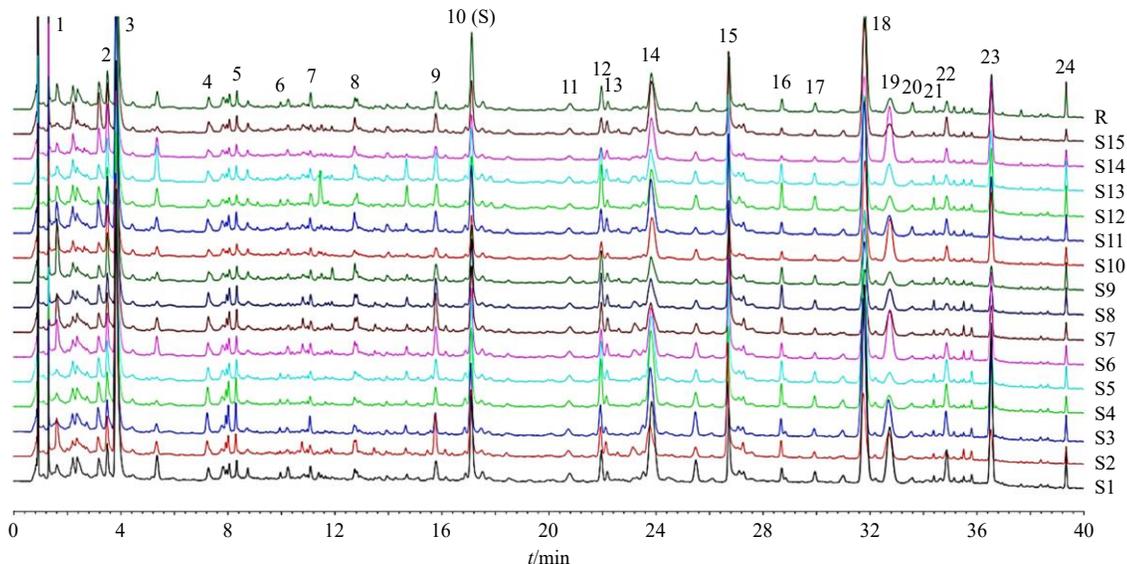
RSD 值, 结果各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 2.98%, 相对保留时间的 RSD 均小于 1.44%, 结果表明该仪器精密良好。

**2.2.5 稳定性试验** 取 HGWD 基准样品 (S1), 按照“2.2.1 (1)”项下制备方法制备供试品溶液, 分别在室温下放置 0、3、6、9、12、18、24 h, 按照“2.2.3”项下色谱条件进样分析, 分别采集 UPLC 指纹色谱图, 以 10 号峰芍药苷为参照峰 (S), 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值, 各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 2.89%, 相对保留时间 RSD 均小于 0.20%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.2.6 重复性试验** 取 HGWD 基准样品 (S1), 按照“2.2.1 (1)”项下制备方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.2.3”项下色谱条件进样分析, 分别采集 UPLC 指纹色谱图, 以 10 号峰芍药苷为参照峰 (S), 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积

的 RSD 值, 结果各相对峰面积的 RSD 均小于 2.79%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.32%, 表明该方法重复性良好。

**2.2.7 指纹图谱的建立与相似度评价** 取 15 批 HGWD 基准样品, 按照“2.2.1 (1)”项下制备方法制备供试品溶液, 分别精密吸取上述供试品溶液和“2.2.2”项下对照品溶液各 1 μL, 按照“2.2.3”项下色谱条件进样分析, 分别采集 UPLC 色谱图。将 15 批 HGWD 基准样品 UPLC 指纹图谱数据结果, 导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012.130723 版》, 选取 S1 为参照图谱, 时间宽度设为 0.1 min, 采用中位数法, 进行峰多点校正和全峰自动匹配, 生成 HGWD 基准样品指纹图谱及其对照指纹图谱 (R), 结果见图 1。共标定 24 个色谱峰, 通过对照品的色谱峰比对, 共指出 8 个色谱峰 (图 2), 分别为 8 号色谱峰氧化芍药苷、10 号色谱峰芍药苷、12 号色谱峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷、14 号色谱峰香豆素、



8-氧化芍药苷; 10-芍药苷; 12-毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 14-香豆素; 18-肉桂酸; 19-肉桂醛; 20-槲皮素; 24-6-姜酚; 图 2 同。  
8-oxypaeoniflorin; 10-paeoniflorin; 12-calycosin-7-glucoside; 14-coumarin; 18-cinnamic acid; 19-cinnamaldehyde; 20-quercetin; 24-6-gingerol; same as figure 2.

图 1 15 批 HGWD 基准样品 (S1~S15) 的 UPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 UPLC fingerprint of 15 batches of HGWD benchmark samples (S1—S15) and its control fingerprint (R)

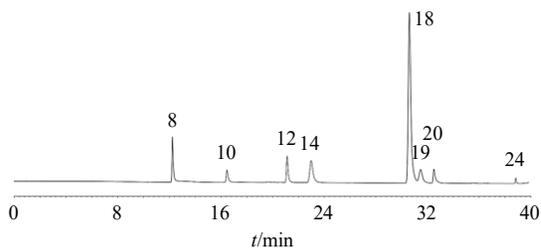


图 2 混合对照品溶液的 UPLC 图

Fig. 2 UPLC of mixed reference substance solution

18 号色谱峰肉桂酸、19 号色谱峰肉桂醛、20 号色谱峰槲皮素、24 号色谱峰为 6-姜酚。

以对照指纹图谱为参照, 计算 15 批基准样品相似度评价结果分别为 0.987、0.990、0.984、0.994、0.934、0.947、0.974、0.971、0.995、0.985、0.975、0.956、0.988、0.974、0.987, 平均为 0.976, RSD 为 1.8%, 结果见表 3。表明 15 批 HGWD 基准样品指纹图谱的相似度良好, 制备工艺稳定且可靠有效,

表 3 15 批次 HGWD 指纹图谱相似度评价结果

Table 3 Results of similarity evaluation of fingerprint profiles of 15 batches of HGWD benchmark samples

样品	相似度															
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S1	1.000	0.984	0.976	0.981	0.878	0.894	0.937	0.978	0.973	0.968	0.938	0.960	0.978	0.991	0.970	0.987
S2	0.984	1.000	0.992	0.974	0.907	0.928	0.957	0.950	0.984	0.981	0.954	0.922	0.987	0.969	0.978	0.990
S3	0.976	0.992	1.000	0.967	0.885	0.911	0.944	0.950	0.984	0.975	0.937	0.910	0.986	0.968	0.975	0.984
S4	0.981	0.974	0.967	1.000	0.935	0.946	0.959	0.975	0.987	0.969	0.968	0.972	0.975	0.975	0.973	0.994
S5	0.878	0.907	0.885	0.935	1.000	0.992	0.956	0.852	0.930	0.917	0.974	0.874	0.909	0.844	0.924	0.934
S6	0.894	0.928	0.911	0.946	0.992	1.000	0.964	0.869	0.945	0.931	0.972	0.879	0.921	0.863	0.938	0.947
S7	0.937	0.957	0.944	0.959	0.956	0.964	1.000	0.920	0.971	0.970	0.985	0.910	0.954	0.907	0.982	0.974
S8	0.978	0.950	0.950	0.975	0.852	0.869	0.920	1.000	0.961	0.947	0.914	0.986	0.956	0.982	0.943	0.971
S9	0.973	0.984	0.984	0.987	0.930	0.945	0.971	0.961	1.000	0.975	0.971	0.943	0.991	0.964	0.984	0.995
S10	0.968	0.981	0.975	0.969	0.917	0.931	0.970	0.947	0.975	1.000	0.970	0.919	0.968	0.956	0.979	0.985
S11	0.938	0.954	0.937	0.968	0.974	0.972	0.985	0.914	0.971	0.970	1.000	0.918	0.957	0.912	0.968	0.975
S12	0.960	0.922	0.910	0.972	0.874	0.879	0.910	0.986	0.943	0.919	0.918	1.000	0.935	0.959	0.920	0.956
S13	0.978	0.987	0.986	0.975	0.909	0.921	0.954	0.956	0.991	0.968	0.957	0.935	1.000	0.963	0.971	0.988
S14	0.991	0.969	0.968	0.975	0.844	0.863	0.907	0.982	0.964	0.956	0.912	0.959	0.963	1.000	0.952	0.974
S15	0.970	0.978	0.975	0.973	0.924	0.938	0.982	0.943	0.984	0.979	0.968	0.920	0.971	0.952	1.000	0.987
R	0.987	0.990	0.984	0.994	0.934	0.947	0.974	0.971	0.995	0.985	0.975	0.956	0.988	0.974	0.987	1.000

各不同产地、不同批次供试品之间的主要物质群差异较小。

**2.2.8 共有指纹峰归属** 精密吸取供试品溶液、缺黄芪阴性溶液、黄芪单味中药溶液、缺桂枝阴性溶液、桂枝单味中药溶液、缺白芍阴性溶液、白芍单味中药溶液、缺生姜阴性溶液、生姜单味中药溶液、缺大枣阴性溶液、大枣单味中药溶液，按照“2.2.3”项下色谱条件方法，记录 UPLC 色谱图。通过对比分析，对 24 个共有峰进行归属，色谱图对比结果见

图 3。1、3~5、8（氧化芍药苷）、10（芍药苷）、13、15 号峰归属于白芍；6、18（肉桂酸）、19（肉桂醛）、22、23 号峰归属于桂枝；12（毛蕊异黄酮葡萄糖苷）、16、17、20（槲皮素）、21 号峰归属于黄芪；24（6-姜酚）号峰归属于生姜；2 号峰归属于全方 5 味中药；7 号峰为黄芪、桂枝、白芍和生姜的共有峰；9、11、14（香豆素）号峰为桂枝和白芍的共有峰。

**2.2.9 聚类热图分析** 将 15 批 HGWD 基准物质的

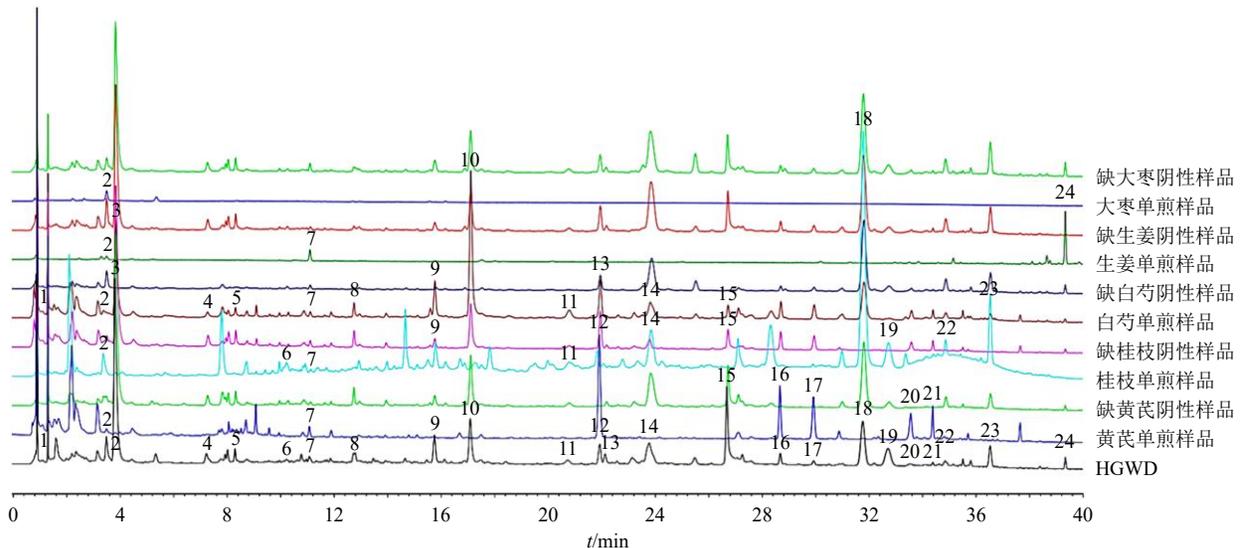


图 3 HGWD 中共有峰归属色谱图

Fig. 3 Chromatogram of attribution of common peaks of HGWD

24 个共有峰的峰面积数据导入 Oebiotech Cloud 在线数据分析平台 (<https://cloud.oebiotech.com>), 采用聚类热图交互进行聚类分析, 结果见图 4。从聚类结果分析, 15 批次样品结果可分为 2 类, 产地为 S4、S5、S8、S9、S12、S13 归为 I 类, 剩余 9 个产地 (S1~S3、S6、S7、S10、S11、S14、S15) 归为 II 类, 推测出现的原因由于不同产地药材质量差异不同导致各成分含量不同; 24 共有峰结果可分为 3 类, 3~5、9~11、13、15 号峰归为 I 类, 7、12、16、

17、21、24 号峰归为 II 类, 1、2、6、8、14、18~20、22、23 号峰归为 III 类。

与指纹峰归属对比分析, 发现与 24 共有峰聚类结果有相似之处: 发现归属白芍的 3~5、9 (白芍、桂枝共有峰)、10、11、13、15 号峰归为 I 类, 归属白芍 2 的 (全方共有峰)、8 号峰归为 III 类, 归属黄芪的 7 (黄芪、桂枝、白芍、大枣共有峰)、12、16、17、21 号峰归为 II 类, 归属桂枝的 6、14、18、19、22、23 归为 III 类。

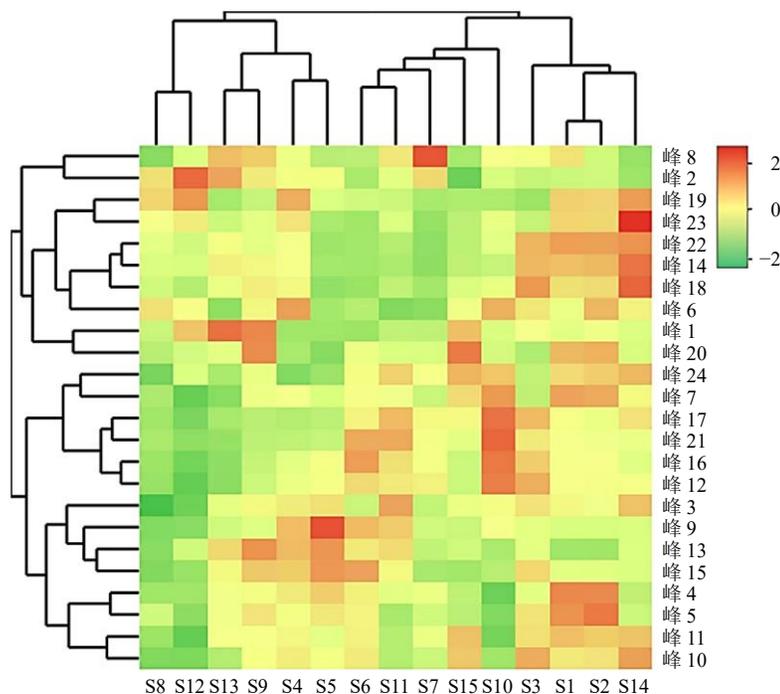


图 4 15 批黄芪桂枝汤基准样品指纹图谱共有峰聚类热图分析

Fig. 4 Heat map analysis of shared peak clustering of fingerprint profiles of 15 batches of HGWD benchmark samples

从整体聚类热图分析, 批次与批次之间各成分含量相差较大, I、II、III 类色谱峰在整体聚类热图中分布散乱, 未较集中出现, 分析原因可能是由于 15 批次基准样品采用各单味药随机数表法组合, 导致高优质产地与低劣质产地随机组合, 各批次之间成分含量 (峰面积) 出现优劣之分, 本课题后续将会继续展开相关研究, 在 15 批次基准样品随机数表法组合基础上, 开展优选 15 批 HGWD 基准样品, 为后续制剂开发提供科学实验依据。

## 2.3 Q-Marker 含量测定研究

2.3.1 色谱条件 同“2.2.3”项。

2.3.2 供试品溶液制备 同“2.2.1”项下 HGWD 基准样品供试品溶液 (1) 制备方法。

2.3.3 对照品溶液制备 同“2.2.2”项下对照品溶液制备方法。

2.3.4 线性关系考察 精密量取“2.3.3”项下对照品母液, 用倍比稀释法配制系列混合对照品溶液。按照“2.3.1”项下色谱条件分别进样分析, 测定峰面积。以对照品溶液的质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 绘制标准曲线, 按最小二乘法求其线性回归方程, 结果分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷  $Y=9860X+4875$ ,  $R^2=0.9999$ , 线性范围  $3.13\sim 50.15\ \mu\text{g/mL}$ ; 肉桂酸  $Y=29850X+9358$ ,  $R^2=1.0000$ , 线性范围  $1.92\sim 30.68\ \mu\text{g/mL}$ ; 芍药苷  $Y=3526X+93580$ ,  $R^2=0.9999$ , 线性范围  $137.31\sim 2197.00\ \mu\text{g/mL}$ ; 6-姜酚  $Y=1985X+1263$ ,  $R^2=0.9999$ , 线性范围  $2.94\sim 47.00\ \mu\text{g/mL}$ ; 结果表明各成分在各自质量浓度范围内线性关系良好。

2.3.5 精密度考察 精密吸取 HGWD (S1) 各供试品溶液  $1\ \mu\text{L}$ , 按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,

连续进样 6 次，测定峰面积，计算得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷、6-姜酚峰面积的 RSD 分别为 2.5%、1.9%、2.1%、2.3%，结果表明该仪器精密度良好。

**2.3.6 稳定性考察** 制备 HGWD(S1)供试品溶液，分别在室温下放置 0、2、4、6、8、10、12、24 h，按照“2.3.1”项下色谱条件进样分析，测定峰面积，计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷、6-姜酚峰面积的 RSD 分别为 1.6%、0.3%、0.5%、0.6%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.7 重复性考察** 平行制备 HGWD(S1)各供试品溶液 6 份，按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定，记录 UPLC 色谱图，计算各组分的 RSD 值，结果得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷、6-姜酚质量分数的 RSD 分别为 1.4%、1.1%、1.1%、1.3%，表明该样品制备方法重复性良好。

**2.3.8 加样回收率考察** 根据《中国药典》2020 年版中对于中药含量测定回收率浓度要求，设定低、中、高 3 种不同质量浓度进行回收率研究。取已知指标成分含量的 HGWD 基准样品 (S1) 0.25 g，共 9 份，分别按照待测成分量与对照品加入量 1:0.5、1:1、1:1.5 的比例加入毛蕊异黄酮葡萄糖苷、

肉桂酸、芍药苷和 6-姜酚对照品溶液，每个质量浓度设置 3 个平行样品，按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定，记录 UPLC 色谱图，计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷和 6-姜酚的加样回收率。结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷、6-姜酚的平均加样回收率分别为 104.25%、99.10%、102.54%、100.00%，RSD 分别为 3.2%、1.4%、2.8%、2.3%，表明该分析方法的准确度良好。

**2.3.9 含量测定** 精密称取 15 批 HGWD 基准样品，按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，分别精密吸取上述供试品品溶液和“2.3.3”项下对照品溶液各 1 μL，注入液相色谱仪，按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定，记录 UPLC 图，测定峰面积，计算各基准样品中 Q-Marker 含量，结果见表 4。15 批 HGWD 基准样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷及 6-姜酚的质量分数分别为 115.49~494.96、254.68~760.79、3 106.72~6 049.40、232.61~704.10 μg/g，各指标成分大部分都在其均值的±30%范围内，说明基准样品的制备工艺相对稳定且有效。其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷有 6 批次，肉桂酸有 5 批次、芍药苷有 2 批次、6-姜酚有 4 批次超出均值±30%范围，但浮动也在范围附近。

表 4 15 批 HGWD 基准样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷及 6-姜酚的含量 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Contents of calycosin-7-glucoside, cinnamic acid, paeoniflorin and 6-gingerol in 15 batches of HGWD benchmark samples ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

批号	质量分数/(μg·g <sup>-1</sup> )				批号	质量分数/(μg·g <sup>-1</sup> )			
	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	肉桂酸	芍药苷	6-姜酚		毛蕊异黄酮葡萄糖苷	肉桂酸	芍药苷	6-姜酚
HGWD-1	303.21±1.94	528.45±3.02	5 250.43±0.10	502.65±1.26	HGWD-10	428.71±0.93	419.11±3.73	3 795.74±0.08	554.12±0.66
HGWD-2	494.96±2.12	550.70±2.19	5 467.21±0.07	336.07±2.07	HGWD-11	342.39±3.71	353.85±3.95	3 835.46±0.33	569.38±2.23
HGWD-3	390.57±2.87	643.55±1.21	6 047.20±0.06	422.94±4.21	HGWD-12	115.49±0.38	317.31±0.32	3 323.36±0.02	295.58±1.26
HGWD-4	283.12±2.55	501.21±1.97	4 918.73±0.11	360.55±3.37	HGWD-13	163.20±3.22	464.60±1.47	3 712.29±0.41	232.61±1.73
HGWD-5	305.20±1.35	254.68±1.25	4 726.00±0.14	339.61±4.41	HGWD-14	328.68±2.61	760.79±4.12	6 049.41±0.11	704.10±1.38
HGWD-6	355.24±3.25	264.29±1.93	4 867.10±0.17	517.94±1.28	HGWD-15	247.35±2.29	411.63±1.53	5 571.30±0.23	660.00±2.34
HGWD-7	329.37±4.67	279.72±1.66	4 130.11±0.06	517.03±1.79	平均值	299.83±2.59	441.79±2.04	4 651.88±0.18	455.45±1.89
HGWD-8	172.90±1.23	378.61±3.18	3 106.68±0.06	339.49±1.30	RSD/%	34	33	21	30
HGWD-9	237.00±2.73	498.41±0.89	4 975.87±0.23	481.64±1.11					

《中国药典》2020 年版规定药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量不少于 0.020%，芍药苷含量不得少于 1.6%、6-姜辣素含量不得少于 0.050%，肉桂酸含量并没有明确规定。分析原因，主要是饮片-汤液、汤液-基准样品 (冻干粉)，应充分考虑 Q-Marker 成分的有效传递，药材有效成分在传递到基准样品过程

中，受炮制、干燥、煎煮、提取等工艺影响<sup>[14-16]</sup>，量值传递率也大幅度下降。

在 HGWD 基准样品 Q-Marker 含量测定中，虽量值传递率降低，除黄芪中有 3 批次外，其余批次毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量均不少于 0.020%，仍满足《中国药典》2020 年版中对药材含量要求，白芍所

有批次均大于 1.6%；分析肉桂酸含量 RSD 较大原因，与不同产地的桂枝药材性状、生长习性有关<sup>[7]</sup>，桂枝为肉桂的干燥嫩枝，肉桂生长年限越久，嫩枝中的肉桂酸含量就越低，所以一般选用生长年限较低的嫩枝；6-姜酚化学性质不稳定，在复方煎煮过程中，温度过高、煎煮时间过长都可能导致 6-姜酚挥发，不同提取方法对姜酚类化合物的含量也有影响<sup>[18-19]</sup>；此外，在药材的成分含量限定中，产地限量范围较宽，导致基准样品之间各别批次的成分含量出现较大差距，本课题研究下一步将控制 4 味药材的含量限度，以确保基准样品各成分含量在均值的±30%范围内。

**2.3.10 量值传递评价** 按照“2.1”项下制备方法制备 15 批 HGWD 标准汤液和各单味中药饮片标准煎液。各量取 10 mL 煎液，于 4 ℃、4 000 r/min、离心 10 min，取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，制得 15 批 HGWD 标准汤液和各单味中药饮片标准煎液的供试品溶液。分别精密吸取上述 HGWD 标准汤液供试品溶液、各单味饮片标准煎液供试品溶液和“2.3.3”项下含量测定对照品溶液各 1 μL，按照“2.3.1”项下色谱条件进样分析，分别采集 UPLC 指纹色谱图，测定峰面积，计算 Q-Marker 在饮片-汤

液和汤液-基准样品的转移率。另精密吸取 15 批 HGWD 标准汤液 100 mL，置于蒸发皿中，水浴蒸干，减压干燥（60℃）24 h 后，置干燥器中恒定质量，称定重量，计算 15 批 HGWD 基准样品出膏率，结果见表 5。结果显示，15 批 HGWD 出膏率为 11.63%~14.14%，平均出膏率为 12.77%；饮片-汤液中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷及 6-姜酚的转移率分别 8.23%~19.66%、23.52%~41.21%、29.15%~41.23%、14.58%~30.07%，平均转移率分别为 14.13%、31.82%、37.07%、23.63%；汤液-基准样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷及 6-姜酚的转移率分别 86.35%~97.67%、90.34%~98.13%、91.51%~98.88%、93.53%~98.29%，平均转移率分别为 93.02%、95.77%、95.69%、97.05%。

饮片-汤液转移率=汤液中 Q-Marker 质量浓度×汤液总体积/(单味饮片煎液中 Q-Marker 质量浓度×单味饮片煎液总体积)

汤液-基准样品转移率=基准样品中 Q-Marker 质量分数×基准样品质量/(汤液中 Q-Marker 质量浓度×汤液总体积)

出膏率=干膏质量×标准汤液总体积/(取样体积×总饮片质量)

表 5 HGWD 饮片、汤液、基准样品中 Q-Marker 转移率及 HGWD 基准样品的出膏率

Table 5 Transfer rate of Q-Marker in HGWD slices, soups and benchmark samples and paste extraction rate of HGWD benchmark samples

批号	出膏率/ %	饮片-汤液转移率/%				汤液-基准样品转移率/%			
		毛蕊异黄酮 葡萄糖苷	肉桂酸	芍药苷	6-姜酚	毛蕊异黄酮 葡萄糖苷	肉桂酸	芍药苷	6-姜酚
S1	14.14	14.93	34.23	29.15	22.62	97.63	94.82	91.51	97.82
S2	12.70	10.91	27.53	33.47	17.26	97.67	96.41	97.18	95.66
S3	12.57	18.95	38.25	38.82	27.98	97.29	95.58	96.15	96.71
S4	12.11	8.23	23.52	36.98	16.24	95.80	98.13	96.90	94.23
S5	13.43	16.27	31.55	38.34	21.28	97.35	91.60	94.74	96.69
S6	11.94	18.29	39.59	39.76	29.32	97.48	92.05	97.06	97.13
S7	12.44	13.59	28.87	41.23	18.60	93.89	93.64	93.90	97.59
S8	12.32	17.61	35.57	36.65	25.30	89.60	95.66	91.72	96.30
S9	12.78	15.80	30.21	33.99	19.94	96.89	95.90	96.13	98.29
S10	13.63	9.57	24.86	40.01	14.58	95.71	94.56	95.53	97.69
S11	13.94	14.48	36.91	37.53	22.64	93.40	93.58	95.95	98.12
S12	12.13	10.12	25.94	34.27	16.45	86.35	90.34	93.30	96.14
S13	13.51	19.66	41.21	36.45	30.07	88.51	93.11	95.85	93.53
S14	12.27	12.25	32.89	38.89	23.96	96.87	95.65	98.88	97.64
S15	11.63	11.34	26.19	40.57	15.92	92.85	90.54	97.72	98.12
$\bar{x} \pm s$	12.77±0.77	14.13±3.64	31.82±5.67	37.07±3.24	23.63±5.08	94.97±3.90	94.10±2.27	95.50±2.12	96.78±1.42

对结果进行分析,发现 Q-Marker 在饮片-汤液中的转移率普遍偏低,可能同标准煎液制备方法条件下,制备 15 批 HGWD 标准汤液和各单味饮片标准煎液中,前者有效成分的溶出率低于后者,复方中的药味成分多,难以将成分全部溶出,而单味饮片煎煮时,相对溶出率较高;Q-Marker 在汤液-基准样品中的转移率偏高,主要原因取决于基准样品干燥工艺对有效成分的损耗率,但从结果中发现,除个别批次的毛蕊异黄酮葡萄糖苷稍低外(未超过均值 5%),其余各批次的 Q-Marker 转移率均大于 90%,说明基准样品干燥工艺稳定、损耗率低。

综上,Q-Marker 从饮片到汤液、汤液到基准样品中,前者转移率普遍低于后者,饮片到汤液主要深受煎煮工艺的影响,特别是从饮片到汤液转移过程中,应该充分考虑饮片的浸泡时间、加水量、煎煮时间等<sup>[20]</sup>,从而提高有效成分的转移率;汤液到基准样品中的转移率是后续制剂开发的关键因素,应充分保证基准样品质量的稳定性、准确度<sup>[21]</sup>,才能为后续 HGWD 制剂开发提供可靠的物质基础。

### 3 讨论

#### 3.1 指纹图谱条件分析

HGWD 由黄芪、桂枝、白芍、生姜、大枣 5 味中药组成,相比单味中药,中药复方化学成分多且种类复杂,为了尽可能获得全方化学成分和指纹图谱信息,更加准确测定 Q-Marker 含量,本研究对 HGWD 的色谱条件和供试品溶液制备方法进行考察研究。

精密吸取供试品溶液,注入液相色谱仪,经 PDA 检测器进行全波长(200~400 nm)扫描,结果检测波长为 0~18 min, 230 nm; 18.5~24.5 min, 260 nm; 24.5~40 min, 280 nm 时,能得到最多的指纹峰且各峰强度均适中,采集的指纹图谱信息量大。芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷色谱峰分别在 232.2、260.2 nm 有最大吸收,肉桂酸和 6-姜酚色谱峰在 280 nm 有最大吸收,综合考虑,分段设置波长扫描能够覆盖标志性色谱峰以及其他相关色谱峰。

流动相系统分别考察了乙腈-水、乙腈-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.10%磷酸水溶液、乙腈-0.15%磷酸水溶液、乙腈-0.20%磷酸水溶液的洗脱系统,根据色谱图出峰情况,发现流动相为乙腈-0.15%磷酸水溶液与乙腈-0.20%磷酸水溶液系统色谱图,相差无几,出峰较多且分离效果较好,考虑到 pH 值对色谱柱的影响,故以乙腈-0.15%磷酸水溶液为流动

相系统。

色谱柱考察分别对比了 2 种不同型号的色谱柱 Acquity UPLC HSS T3 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)和 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),发现 Acquity UPLC HSS T3 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱下出峰较多,分离效果较好,因此,选择 Acquity UPLC HSS T3 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)。

在考察不同进样量(1、2、3 μL)和不同柱温(25、30、35 °C)对色谱峰的影响时,发现进样量和柱温越高对色谱峰分离效果越差,进样量大于 2 μL 时,对色谱峰前 15 min 左右的影响较大,出现溶剂效应,当柱温升高时,色谱柱对样品成分的选择性降低,尤其是对主成分:肉桂酸、6-姜酚分离度较差,柱温过低时,保留时间短、柱效下降;选择进样体积为 1 μL、柱温为 30 °C,各色谱峰的分离效果好、峰性稳定、保留时间适宜。

供试品溶液的制备考察中,首先考察提取方法及提取时间,对比超声 15、30、45 min 和回流 30、60、90 min,结果发现超声提取 30 min 即可达到有效成分的充分提取,且相对节能方便。考察提取溶剂(水及 25%、50%、75%、100%甲醇),结果发现 75%甲醇溶液作为溶剂时,所得单位浓度峰面积最大,色谱峰基线更加平稳。考察提取溶剂体积(75%甲醇 10、20、30 mL)和不同取样量(0.20、0.50、1.00 g),结果发现溶剂体积为 10、30 mL 时,在 22~24 min 时峰个数较溶剂体积为 20 mL 少,取样量为 0.50 g 时,各色谱峰单位浓度峰面积及峰强度较适宜,最终确定提取溶剂体积为 20 mL、取样量为 0.50 g。通过以上研究,确立了黄芪桂枝五物基准样品 UPLC 指纹图谱的分析方法,保证色谱图结果的准确、稳定。

#### 3.2 Q-Marker 分析

基于本实验室先前对 HGWD 基准样品化学成分分析及表征研究<sup>[22]</sup>,采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间-串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS),在正、负离子模式下对基准样品进行质谱数据采集,通过化合物的二级碎片离子信息及与对照品比对,一共从基准样品中表征出 123 化学成分,其中包含本实验测定的 4 个 Q-Marker。通过以上实验室先前建立的实验方法,能够快速、准确地表征 HGWD 基准样品(冻干粉)中的化学成分,为本实验建立该复方的指纹图谱和测定 Q-Marker 含量提供可靠信

息和依据。

据《金匱要略》中记载，HGWD 是一种益气温经、和血通痹功效的中医方剂：黄芪为君药，桂枝和白芍为臣药，生姜为佐使药<sup>[2]</sup>。药理学研究表明，黄芪的特有成分包含皂苷类、黄酮类等化合物，其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷常作为黄芪的 Q-Marker<sup>[23-25]</sup>，具有抑制 NF- $\kappa$ B 活化和提高凋亡相关基因 cleaved Caspase-3 蛋白的表达，发挥抗炎、抗肿瘤等作用<sup>[26-27]</sup>；桂枝的特有成分包含苯丙素类化合物，肉桂酸、肉桂醛为主要活性成分，具有抗菌抗炎、解热发汗、抗癌等药理作用<sup>[28]</sup>；白芍中的 Q-Marker 芍药苷能够抑制血栓形成，治疗心血管功能障碍等疾病<sup>[29]</sup>；佐使药生姜中的姜辣素类成分含量较高，具有抗菌、止吐、抗炎镇痛等药理作用<sup>[30]</sup>。

现代中医药研究发现，HGWD 在固有的或加工制备过程中形成的，与中药功能属性直接相关的 Q-marker 为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷、肉桂酸、肉桂醛、芍药苷等<sup>[31-33]</sup>，这几种成分不仅兼顾君、臣、佐、使组方配伍原则，也直接反应了复方在制备工艺过程中物质传递和化学变化。因此，结合《中国药典》2020 年版中对中药材成分含量测定的要求和考虑能够评价复方质量的标志性成分，故最终选择性质稳定、含量高、专属性强的毛蕊异黄酮葡萄糖苷、肉桂酸、芍药苷、6-姜酚这 4 种成分作为 HGWD Q-Marker 的测定指标。

本实验研究采用建立 UPLC 指纹图谱与 Q-Marker 含量测定 2 种方式，对 HGWD 进行质量评价和控制，并建立其相关方法学，“破旧创新”从对中药复方的药效成分研究到 Q-Marker 研究，避免了传统质量控制主要依赖于药效成分变化，直接在基准样品的研究基础上，将 Q-Marker 作为复方研究重点，有利于评价 HGWD 不同批次之间的质量一致性，为中药复方走向制剂开发、企业生产以及药效物质基础研究提供重要的科学依据。

此外，在实验研究过程中，未对组方中另一质量标志成分黄芪甲苷开展相关指纹图谱和含量测定研究，由于黄芪甲苷属于三萜类皂苷化合物<sup>[34]</sup>，分子结构中不含有共轭结构，无紫外特征吸收，因此后续会继续开展相关实验研究，建立黄芪甲苷 UPLC 指纹图谱和含量测定的方法学，从而全面的对 HGWD 进行质量控制，建立更完整的中药质量评价体系。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 国家中医药管理局, 国家药品监督管理局. 关于发布《古代经典名方关键信息考证原则》《古代经典名方关键信息表(16 首方剂)》(2020-11-11) [2021-10-29]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/fgwj/gzwwj/gzwwjyp/2020111091109170.html>.
- [2] 李克光, 张家礼. 金匱要略 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 183.
- [3] Zhang Z W, Ye J, Liu X Y, et al. Huangqi Guizhi Wuwu Decoction alleviates oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via the gut-peripheral nerve axis [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 114.
- [4] 吴春锋. 加味黄芪桂枝五物汤治疗糖尿病周围神经病变临床研究 [J]. 实用中医药杂志, 2024, 40(2): 193-195.
- [5] Wang K X, Gao Y, Lu C, et al. Uncovering the complexity mechanism of different formulas treatment for rheumatoid arthritis based on a novel network pharmacology model [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 1035.
- [6] 林婉娜, 苏慧琳, 李慧敏, 等. 黄芪桂枝五物汤抗类风湿性关节炎的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 9-15.
- [7] 张倩. 黄芪桂枝五物汤加减用于脑梗塞恢复期治疗的疗效探析 [J]. 当代临床医刊, 2022, 35(4): 102-103.
- [8] 余爱明, 闫向丽, 王圣鑫, 等. 黄芪桂枝五物汤标准汤剂 HPLC 指纹图谱建立及 3 种成分含量测定 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(9): 2196-2200.
- [9] 汤书婉, 李新亮, 马莉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和 LC-Q-TOF/MS 的加味黄芪桂枝五物汤化学成分研究 [J]. 中草药, 2023, 54(3): 711-721.
- [10] 张顺宵, 陈月, 苟小军. 黄芪桂枝五物汤高效液相色谱指纹图谱及含量测定研究 [J]. 中国药业, 2024, 33(14): 70-75.
- [11] Zhang T J, Bai G, Liu C X. Innovation theory, technical methods and industrial application of quality marker of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 17(1): 84-86.
- [12] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [13] 汤瑜晨, 王龙, 郭翎廷, 等. 经典名方质量标志物的选择方法研究进展及相关思考 [J]. 分析测试学报, 2023, 42(8): 1064-1071.
- [14] 米宏英, 张萍, 高慧媛, 等. 炮制工艺对芫花化学成分、药理毒理及药材质量影响的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2023, 58(10): 865-874.
- [15] 麦韵炫. 白芍等 20 种药材中粗多糖的提取工艺研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.

- [16] 郭明明. 中药提取工艺对药品质量的影响分析 [J]. 黑龙江科学, 2016, 7(12): 130-131.
- [17] 于天颖, 周劲松, 马恩耀, 等. 20 批不同产地桂枝质量研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(10): 57-62.
- [18] 董文南, 柴尧, 郑洋滨, 等. 生姜中姜酚类化合物的制备工艺研究 [J]. 药品评价, 2022, 19(14): 846-850.
- [19] 施丽君, 杨韧强, 严秋兰, 等. 干姜中 3 种姜酚类成分提取工艺研究 [J]. 中医药导报, 2023, 29(9): 47-50.
- [20] 张明令. 中药煎煮质量的主要影响因素分析 [J]. 临床合理用药, 2023, 16(14): 178-181.
- [21] 杨莎莎, 林夏, 黄友, 等. 经典名方关键质量属性及影响因素分析 [J]. 中草药, 2023, 54(4): 1274-1284.
- [22] 韩迪, 王姗姗, 唐嵩媛, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的黄芪桂枝五物汤基准样品化学成分分析及表征 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 141-149.
- [23] 许如玲, 范君婷, 董惠敏, 等. 经典名方黄芪桂枝五物汤标准煎液化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5614-5630.
- [24] 王婷, 冯彦梅, 丁小琴, 等. 甘肃不同产区黄芪有效成分含量比较研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2021, 40(5): 47-50.
- [25] 马宁, 郝娟, 王景雪. HPLC-ELSD 法测定不同产地、剂型黄芪饮片中黄芪甲苷含量 [J]. 山西农业科学, 2020, 48(9): 1431-1434.
- [26] Hwang Y S, Lim J, Yoon H R, *et al.* *Astragalus complanatus* ethanol attenuates septic shock by exerting anti-inflammatory effects on macrophages [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 25(1): 384.
- [27] 赵凯, 尹心宝, 张宗亮, 等. 黄芪皂苷 II 对肾透明细胞癌细胞生长抑制作用及机制 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2023, 61(1): 10-16.
- [28] Peng L X, Lei Z Q, Rao Z L, *et al.* Cardioprotective activity of ethyl acetate extract of *Cinnamomi Ramulus* against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis [J]. *Phytomedicine*, 2021, 93: 153798.
- [29] Ren S, Wang Y G, Zhang Y Y, *et al.* Paeoniflorin alleviates Ang II-induced cardiac hypertrophy in H9c2 cells by regulating oxidative stress and Nrf2 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115253.
- [30] 刘怡妙, 凌悦, 徐旭, 等. 生姜的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2912-2928.
- [31] Chang X Y, Guo G M, Fan Z, *et al.* Simultaneous determination of two bioactive components of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction in rat plasma using UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2018, 27(4): 263-272.
- [32] 卢广英, 王嘉昀, 高祖, 等. 经典名方黄芪桂枝五物汤的研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(20): 5438-5449.
- [33] Jiang M Y, Yang L L, Zou L, *et al.* A comprehensive quality evaluation for Huangqi Guizhi Wuwu Decoction by integrating UPLC-DAD/MS chemical profile and pharmacodynamics combined with chemometric analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 3): 117325.
- [34] 郭雅璇, 李蓉蓉, 秦雪梅, 等. 基于多指标含量测定的恒山黄芪特征成分研究 [J]. 中国现代中药, 2022, 24(8): 1473-1480.

[责任编辑 郑礼胜]