

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)20-0099-04  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.20.021



# 温经汤物质基准高效液相色谱指纹图谱研究\*

华杰, 刘洋, 吴建明<sup>△</sup>, 孔晓霞, 丁京伟, 纪晓燕, 朱婷

(浙江维康药业股份有限公司, 浙江 丽水 323000)

**摘要:**目的 建立温经汤物质基准高效液相色谱指纹图谱。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法, 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.05% 磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.2 mL/min, 检测波长为 230 nm, 柱温为 30 °C, 进样体积 10 μL。以芍药苷峰为对照峰建立 15 批温经汤样品的 HPLC 指纹图谱, 确定共有峰并指认成分, 采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。结果 15 批样品有 14 个共有峰, 指认出其中 4 个, 分别为芍药苷、甘草苷、甘草酸、阿魏酸。15 批样品相似度为 0.958~1.000。结论 建立的温经汤物质基准 HPLC 指纹图谱, 可用于该汤剂的质量控制。

**关键词:** 温经汤; 物质基准; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 质量控制

## HPLC Fingerprint of Wenjing Decoction Substance Reference

HUA Jie, LIU Yang, WU Jianming, KONG Xiaoxia, DING Jingwei, JI Xiaoyan, ZHU Ting

(Zhejiang Wecome Pharmaceutical Co., Ltd., Lishui, Zhejiang, China 323000)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of the Wenjing Decoction substance reference. **Methods** The HPLC method was adopted. The chromatographic column was the Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.05% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.2 mL/min, the detection wavelength was 230 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. The HPLC fingerprint of 15 batches of Wenjing Decoction was established with the paeoniflorin peak as the reference, the common peaks were marked, the components were identified, and the similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (version 2012) was used for similarity evaluation. **Results** There were 14 common peaks were marked, and four of them were identified, including paeoniflorin, liquiritin, glycyrrhizic acid and ferulic acid. The similarity of 15 batches of samples was in the range of 0.958 - 1.000. **Conclusion** The established HPLC fingerprint of Wenjing Decoction substance reference can be used for the quality control of this decoction.

**Key words:** Wenjing Decoction; substance reference; HPLC; fingerprint; quality control

温经汤出自宋代陈自明《妇人大全良方》,由当归、川芎、白芍、肉桂、牡丹皮、莪术、人参、甘草、牛膝组方,有温经补虚、化瘀止痛功效,主治血海虚寒、气血凝滞证<sup>[1]</sup>。收录于国家中医药管理局发布的《古代经典名方目录(第一批)》,可按照现行中药注册 3.1 类新药要求,通过简化注册程序研发古代经典名方温经汤复方制剂。经典名方物质基准是指以古代医籍中记载的经典名方制备方法为依据制备的中药药用物质的标准,除制剂成型工艺外,其余制备方法应与古代医籍记载基本一致,名为“遵古”。物质基准在经典名方研发过程中起到承上启下的作用,是保证临床疗效不降低、产品质量稳定一致的核心环节。近现代对温经汤物质基准质量标准鲜有报道,本研究中拟系统研究温经汤物质基准,为其质量控制提供更深层次依据。中药指纹图谱是目前中药产品质量控制主要手段之一,可更全面地反

映中药产品整体特征<sup>[2]</sup>。中药指纹图谱是一种综合的、可量化的鉴定手段,其建立在中药化学成分系统研究的基础上,主要用于评价中药材及中药制剂半成品质量的真实性、优良性和稳定性<sup>[3]</sup>。基于现代文献报道,本研究中利用高效液相色谱(HPLC)法建立温经汤基准样品的指纹图谱,为该汤剂物质基准质量标准的制订提供参考。现报道如下。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

1260 II 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);BK-900B 型超声仪(济南巴克超声波仪器科技有限公司);MS205DU 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为 0.01 mg);FA2004 型电子天平(上海舜宇恒平仪器有限公司,精度为 0.1 mg);SQP 型电子天平(赛多利斯科学仪器 <北京> 有限公司,精度为 1 mg);LD610-2 型电

\* 基金项目:浙江省丽水开发区科技计划项目[2022KFQZDYF05]。

第一作者:华杰,女,硕士研究生,工程师,研究方向为药品的研发、质量控制及生产工艺,(电子信箱)1107783507@qq.com。

<sup>△</sup>通信作者:吴建明,男,大学本科,高级工程师,研究方向为从事药品的研发、质量控制及生产工艺,(电子信箱)985978031@qq.com。

子天平(沈阳龙腾电子科技有限公司,精度为10 mg)。

## 1.2 试药

温经汤基准样品(批号分别为D-22032701、D-22033001、D-22033002、D-22033003、D-22033004、D-22033005、D-22033006、D-22033007、D-22033008、D-22033009、D-22033010、D-22033011、D-22033012、D-22033013、D-22033014、D-22033015,浙江维康药业股份有限公司);对照品芍药苷(批号为110715-201821,含量95.4%),甘草苷(批号为111610-201607,含量93.1%),甘草酸铵(批号为110731-201720,含量97.7%),阿魏酸(批号为110773-201614,含量99.0%),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、磷酸均为色谱纯,乙醇、甲醇均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~25 min时14%A → 22%A, 25~55 min时22%A → 52%A);流速:1.2 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液制备

取芍药苷对照品适量,精密称定,加70%甲醇制成每1 mL含40 μg的对照品溶液。取温经汤基准样品约0.2 g,精密称定,置25 mL容量瓶中,加稀乙醇20 mL,超声(功率320 W、频率40 kHz,下同)处理30 min,放冷,用稀乙醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。以70%甲醇为空白溶剂。

### 2.3 方法学考察

#### 2.3.1 系统适用性试验

取上述对照品溶液、供试品溶液、空白溶剂各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果理论板数按芍药苷峰计应不低于3 000;分离度均大于1.5,基线分离良好。详见图1。

#### 2.3.2 精密度试验

取2.2项下供试品(批号为D-22032701)溶液适

量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,以芍药苷峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果的RSD分别小于0.6%及2.0%(n=6),表明方法精密度良好。

#### 2.3.3 稳定性试验

取2.2项下供试品溶液(批号为D-22032701)适量,分别于室温下放置0,3,6,9,12,24,36 h时按2.1项下色谱条件进样测定,计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果的RSD分别小于0.6%及2.0%(n=7),表明供试品溶液在室温放置36 h内基本稳定。

#### 2.3.4 重复性试验

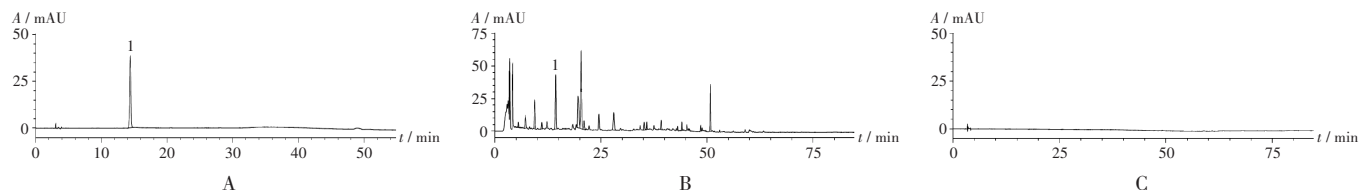
取样品(批号为D-22032701)适量,精密称定,各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,计算各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果的RSD分别小于0.6%及2.0%(n=6),表明方法重复性良好。

#### 2.3.5 耐用性试验

流速考察:取2.2项下供试品溶液(批号为D-22032701)适量,按2.1项下色谱条件(分别设置流速为0.8,1.0,1.2 mL/min)进样测定,记录峰面积。采用国家药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价软件系统(2012版),以重复性试验项下HPLC中色谱峰进行自动匹配,形成共有模式图,并建立对照图谱R。比较两图谱,计算相似度。结果不同流速条件下测定结果基本一致,色谱图中各共有峰峰形尖锐,且对称,分离度良好,相似度均不低于0.99,表明流速发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

柱温考察:取2.2项下供试品溶液(批号为D-22032701)适量,按2.1项下色谱条件(分别设置柱温为25,30,35 °C)进样测定,记录峰面积,与对照图谱R比较,计算相似度。结果不同柱温条件下测定结果基本一致,色谱图中各共有峰峰形尖锐,对称,分离度良好,相似度均不低于0.99,表明柱温发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

酸度考察:取2.2项下供试品溶液(批号为D-



1. 芍药苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 空白溶剂

图1 高效液相色谱图

1. Paeoniflorin

A. Reference solution B. Test solution C. Blank solvent

Fig. 1 HPLC chromatograms

22032701)适量,按2.1项下色谱条件(分别设置流动相中磷酸体积分数为0.02%,0.08%,0.05%)进样测定,记录峰面积,与对照图谱R比较,计算相似度。结果不同酸度条件下测定结果基本一致,色谱图中各共有峰峰形尖锐且对称,分离度良好,相似度均不低于0.99,表明酸度发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

**色谱柱考察:**取2.2项下供试品溶液(批号为D-22032701)适量,按2.1项下色谱条件[分别选择Phenomenex Luna C<sub>18</sub>柱、Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub>柱、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>柱(规格均为250 mm × 4.6 mm, 5 μm)]进样测定,记录峰面积,与对照图谱R比较,计算相似度。结果不同品牌色谱柱条件下测定结果基本一致,色谱图中各共有峰峰形尖锐,对称,分离度良好,相似度均不低于0.99,表明色谱柱品牌发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

**色谱仪考察:**取2.2项下供试品溶液(批号为D-22032701)适量,按2.1项下色谱条件(仪器型号分别为Shimadzu LC-20AT、Agilent 1260 II)进样测定,记录峰面积,与对照图谱R比较,计算相似度。结果不同仪器测定结果基本一致,色谱图中各共有峰峰形尖锐,对称,分离度良好,相似度均不低于0.99,表明色谱仪发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

## 2.4 指纹图谱研究

**指纹图谱建立:**取样品15批,每批2份,按2.2项下方法制备30批供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定。将所得色谱图导入中药指纹图谱相似度评价系统(2012版)软件,得HPLC叠加指纹图谱(见图2)和对照指纹图谱(见图3)。

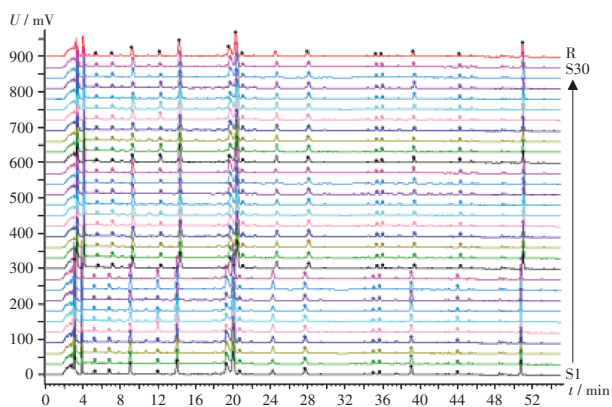


图2 15批样品高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 2 HPLC superimposed fingerprint of 15 batches of samples

**共有峰归属及指认:**通过文献分析选择各药味相关的主要成分,选择芍药苷、甘草苷、甘草酸、阿魏酸对照品进行峰定位研究。详见图4。通过对照品比对确认了4个已知成分(芍药苷、甘草苷、甘草酸、阿魏酸),分

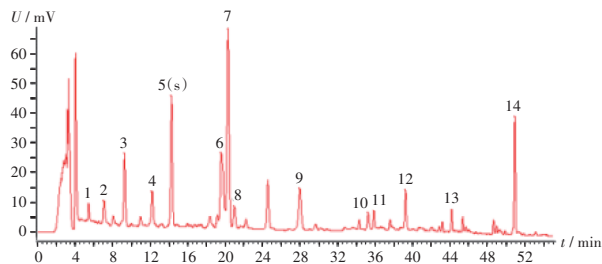
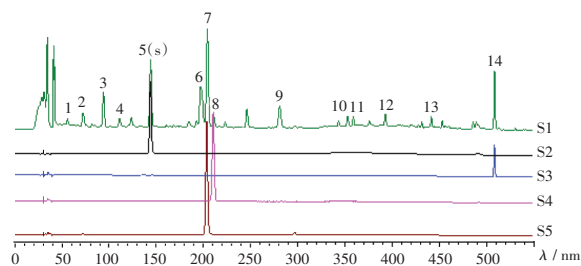


图3 样品高效液相色谱对照指纹图谱

Fig. 3 HPLC reference fingerprint of samples

析结果与质谱结果一致。质谱分析结果与共有峰指认结果对应关系见表2。15批样品指纹图谱共有14个共有峰,通过与对照品溶液色谱图比对,指认出4个共有峰。详见图4。



S1. 供试品溶液 S2 - S5. 对照品溶液(芍药苷,甘草酸,阿魏酸,甘草苷)

图4 相关成分确认高效液相色谱对比图谱

S1. Test solution S2 - S5. Reference solution (paeoniflorin, glycyrrhizic acid, ferulic acid, liquiritin)

Fig. 4 HPLC chromatograms of relevant components identification

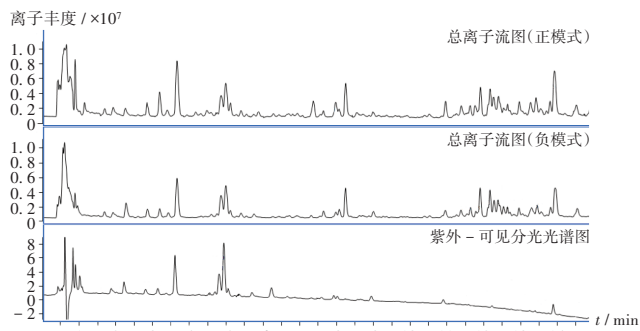


图5 供试品溶液的超高效液相色谱和总离子流图

Fig. 5 UPLC chromatograms and total ion chromatogram of the test solution

指纹图谱相似度评价:根据中药指纹图谱相似度评价系统(2012版)软件计算相似度。结果15批样品相似度为0.964~1.000,表明相似度良好。详见表1。

## 3 讨论

预试验中分别以乙腈为流动相A,以0.05%磷酸水溶液、0.05%甲酸水溶液、0.05%乙酸水溶液为流动相B<sup>[4-9]</sup>进行流动相选择。结果表明,3种不同流动相B,以乙腈-0.05%甲酸水溶液为流动相对色谱基线不平,乙腈-0.05%乙酸溶液较其他2种酸溶液色谱峰数

表1 15批样品指纹图谱相似度评价结果

Tab. 1 Results of similarity evaluation of fingerprint of 15 batches of samples

峰号	R	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
R	1.000	0.991	0.991	0.999	0.999	0.964	0.964	0.978	0.978	0.997	0.997	0.998	0.998	0.999	0.999	0.999
S1	0.991	1.000	1.000	0.993	0.993	0.973	0.972	0.973	0.973	0.987	0.987	0.988	0.987	0.990	0.990	0.987
S2	0.991	1.000	1.000	0.993	0.993	0.973	0.972	0.973	0.973	0.987	0.987	0.988	0.987	0.990	0.990	0.987
S3	0.999	0.993	0.993	1.000	1.000	0.973	0.972	0.981	0.981	0.995	0.995	0.996	0.996	0.997	0.998	0.997
S4	0.999	0.993	0.993	1.000	1.000	0.983	0.972	0.981	0.981	0.995	0.995	0.996	0.996	0.997	0.998	0.987
S5	0.964	0.983	0.983	0.963	0.973	1.000	0.996	0.981	0.981	0.995	0.973	0.973	0.976	0.967	0.968	0.969
S6	0.964	0.973	0.973	0.969	0.968	1.000	0.996	0.981	0.981	0.995	0.973	0.973	0.976	0.977	0.972	0.979
S7	0.974	0.973	0.973	0.973	0.973	1.000	0.996	0.981	0.981	0.995	0.973	0.973	0.976	0.987	0.972	0.979
S8	0.998	0.997	0.997	0.998	0.993	0.996	0.995	0.995	1.000	0.997	0.995	0.998	0.999	0.999	0.994	0.999
S9	0.999	0.993	0.993	1.000	1.000	0.973	0.972	0.981	0.981	0.995	0.995	0.996	0.996	0.997	0.998	0.977
S10	0.999	0.999	0.998	0.998	0.998	0.998	0.999	0.998	0.995	0.999	1.000	0.999	0.997	0.999	0.997	0.998
S11	0.999	0.993	0.993	1.000	1.000	0.973	0.972	0.981	0.981	0.995	0.995	0.996	0.996	0.997	0.998	0.977
S12	0.964	0.973	0.973	0.973	0.983	1.000	0.996	0.981	0.981	0.995	0.973	0.973	0.976	0.977	0.972	0.979
S13	0.999	0.999	0.998	0.998	0.998	0.998	0.999	0.998	0.995	0.999	1.000	0.999	0.997	0.999	0.997	0.998
S14	0.998	0.998	0.997	0.998	0.979	0.996	0.999	0.975	0.994	0.998	0.997	0.997	0.992	0.995	1.000	0.996
S15	0.999	0.989	0.998	0.999	0.958	0.987	0.996	0.981	0.981	0.995	0.973	0.973	0.976	0.967	0.982	0.979

目发生改变,故选择乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相。同时,对比了70%甲醇、甲醇、稀乙醇超声(功率320 W,频率40 kHz)提取所得的色谱峰的差异<sup>[10-15]</sup>。结果表明,在同一洗脱条件下,3种不同溶剂色谱峰数目无差异,对温经汤物质基准对应实物(干膏粉)供试品溶液进行全扫描<sup>[16-18]</sup>。结果显示,检测波长为230 nm时,指纹图谱信息较丰富,分布均匀,分离度较好。

色谱中芍药苷色谱峰分离度及峰形均较好,且保留时间适中,同时将芍药苷对照品作为参照物。本研究中建立了温经汤物质基准HPLC指纹图谱检测方法,通过15批基准样品的测定,确定了对照指纹图谱及14个共有峰并指出其中4个,暂定相似度不得低于0.90。

综上所述,本研究中建立的温经汤物质基准HPLC指纹图谱,可用于该汤剂质量控制。

### 参考文献

[1] 王桂彬,鹿博,花宝金. 温经汤方证探微[J]. 中医学报, 2023,38(2):243-247.  
[2] 刘根才,华杰. 陈皮药材 HPLC 特征图谱的建立[J]. 中国民族民间医药,2022,31(17):54-60.  
[3] 赵圣剑. 指纹图谱的建立对中药复方药效物质基础研究的意义[J]. 国际医药卫生导报,2019,25(13):2158-2159.  
[4] 李秋桐,曹杰,唐婷婷,等. 经典名方温经汤物质基准关键质量成分群的量值传递研究[J]. 时珍国医国药,2022,33(4):873-878.  
[5] 吴革林,滕菲,李祥激,等. 温经汤物质基准多指标成分含量测定及量值传递研究[J]. 中国中药杂志,2021,46(19):5005-5014.  
[6] 吴革林,滕菲,杨丹,等. 经典名方温经汤的基准样品特征图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(22):7-14.  
[7] 张越,陈健,李洋,等. 经典名方温经汤标准汤剂

HPLC 指纹图谱建立及9种成分含量测定[J]. 中草药, 2020,51(18):4664-4672.  
[8] 路娟,柴瑞平,陈曦. 温经汤中6种水溶性活性成分的含量测定[J]. 医药导报,2019,38(4):478-481.  
[9] 柴瑞平,路娟,赵颖,等. 温经汤高效液相色谱指纹图谱的建立[J]. 药学实践杂志,2018,36(6):503-506.  
[10] 邵长森,张国青,韩真真,等. HPLC法同时测定温经汤中10种活性成分的含量[J]. 中国药房,2018,29(19):2640-2643.  
[11] 汤志锋,张云羽,石德志,等. 经典名方温经汤基准样品 HPLC-Q-TOF/MS 分析与指纹图谱研究[J]. 南京中医药大学学报,2023,39(5):452-466.  
[12] 王永春,刘宇心,孟珈同,等. 经典名方温经汤中酒当归炮制工艺优化及其指纹图谱的研究[J]. 中国新药杂志, 2023,32(3):283-293.  
[13] 王永春,董金香,李军鸽,等. UPLC-Q-TOF/MS 技术结合 UNIFI 数据库快速分析经典名方温经汤标准汤剂的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2022,39(6):639-652.  
[14] 蓝义琨,严慕贤,何吉芬,等. 炙甘草汤的高效液相指纹图谱研究[J]. 中医临床研究,2021,13(34):34-36.  
[15] 蔡淑慧,赵华聪,贾萌,等. 基于 HPLC 指纹图谱和多成分定量分析的炒甘草饮片质量评价研究[J]. 中国中药杂志, 2021,46(1):118-124.  
[16] 陈文钧,骆瑶,章建华,等. 淫羊藿-川芎药对 HPLC 指纹图谱建立与骨关节炎的谱效关系研究[J]. 中成药, 2022,44(5):1670-1674.  
[17] 王敏存,贺琪璐,周燕子,等. 丹藤颗粒组成药味 UPLC 指纹图谱的1次稳态投料量研究[J]. 中草药,2022,53(3):704-711.  
[18] 李澍才,王颖. 杞菊地黄丸 HPLC 指纹图谱的建立及特征峰的归属分析[J]. 中国现代应用药学,2021,38(18):2222-2226.

(收稿日期:2023-12-01;修回日期:2024-05-09)