

· 实验研究 ·

基于UHPLC-Q-TOF-MS技术研究葛根汤中药复方颗粒与配方颗粒、汉方颗粒之间的成分差异

张金英¹,周宁¹,刘通¹,王永祥¹,曹玉敏¹,刘振辉¹,郑晓珂^{1,2},冯卫生^{1,2}

(河南中医药大学1药学院,2河南省中药开发工程技术研究中心,郑州450046)

[摘要] **目的:**利用UHPLC-Q-TOF-MS技术结合多元统计方法分析葛根汤中药复方颗粒、配方颗粒(混冲,煎煮)和汉方颗粒的整体差异化学成分并进行半定量分析和成分归属,阐明3种葛根汤颗粒差异的物质基础。**方法:**使用Acclaim™ RSLC 120 C₁₈(100 mm×2.1 mm,2.2 μm)色谱柱,以0.1%甲酸-乙腈为流动相,梯度洗脱,在正、负离子模式下采集数据。首先,结合SIMCA-P 14.0软件对预处理的质谱数据进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA),根据 t 检验和VIP值($P < 0.05$,VIP > 3)筛选差异化学成分的质荷比;然后,通过质荷比在HMDB, PubChem, TCMSP, MassBank等数据库对差异成分进行初筛,根据二级碎片离子及相关参考文献对差异成分定性鉴别;最后,结合半定量数据实现对3种葛根汤颗粒差异成分的全面表征。**结果:**汉方颗粒与中药复方颗粒有40个差异成分,同剂量下,多数差异成分在中药复方颗粒中的含量高于汉方颗粒;配方颗粒(混冲)与中药复方颗粒共鉴定差异成分49个,且多数成分在配方颗粒中含量较高,但一些指标性成分(葛根素、麻黄碱等)在中药复方颗粒中含量较高;配方颗粒混冲和煎煮后进行比较,共鉴定差异成分45个,煎煮后多数成分含量有所升高,但白芍配方颗粒中的主要成分含量有所降低。3种葛根汤颗粒共鉴定差异成分59个,差异成分主要是相对含量上的区别,而非化合物种类的不同,且以君药葛根中差异成分最多。**结论:**该方法可快速全面识别3种葛根汤颗粒的差异成分,为葛根汤颗粒的生产工艺优化以及配方颗粒的质量规范和临床使用提供数据支撑。

[关键词] UHPLC-Q-TOF-MS;葛根汤;复方颗粒;汉方颗粒;配方颗粒;差异成分**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)12-1259-10

Study on differential components of Ge-Gen Decoction compound granules, kampo granules and Ge-Gen Decoction formula granules based on UHPLC-Q-TOF-MS

ZHANG Jin-ying¹, ZHOU Ning¹, LIU Tong¹, WANG Yong-xiang¹, CAO Yu-min¹, LIU Zhen-hui¹, ZHENG Xiao-ke^{1,2}, FENG Wei-sheng^{1,2}

(1 College of Pharmacy, 2 The Engineering and Technology Center for Chinese Medicine Development of Henan Province, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To illustrate the overall differential material basis of three kinds of Ge-Gen Decoction (GGD) granules including Ge-Gen Decoction compound granules (CG), formula granules (mixed, FGm; decocted, FGd) and Kampo granules (KG) using UHPLC-Q-TOF-MS combining with multivariate statistical methods. **Methods:** Acclaim™ RSLC120 C₁₈ chromatographic column (100 mm×2.1 mm,2.2 μm) was employed to separate chemical compositions and gradient elution was performed with 0.1% formic acid-acetonitrile as mobile phase. ESI ion source was used to collect data in positive and negative ion modes respectively. The data were imported into

[基金项目] 国家自然科学基金(81903805);国家重点研发计划(2019YFC1708802);河南省科技重大专项(171100310500)**[作者简介]** 张金英,女,硕士研究生,主要从事中药药效物质基础研究。E-mail:zhang149162@163.com。**[通讯作者]** 冯卫生,男,教授,博士生导师,主要从事中药药效物质基础研究。E-mail:fwsh@hactcm.edu.cn。

SIMCA-P software for principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). Student's *t*-text was utilized to measure the significance values of each metabolite. The *m/z* of differential components were filtered according to $P < 0.05$, $VIP > 3$. Then, HMDB, PubChem, TCMSP, MassBank database, MS/MS ion fragments, and related references were utilized to analyze qualitatively the differential components. Finally, combining with semi-quantitative data, a comprehensive characterization for the differential components of the three GGD granules was described. **Results:** There were 40 differential components between CG and KG, and the contents of most chemical components were higher in CG at the same dose. A total of 49 differential components were identified between CG and FGm. Some of the main active components such as puerarin and ephedrine had higher contents in CG. There were 45 differential components between FGm and FGd and there was no new component detected. The contents of most components increased after decocting. However, some important components in Paeoniae Radix Alba formula granules decreased. Fifty-nine differential components were detected totally in three kinds of Ge-Gen Decoction, and they mainly varied in the relative content, not the types. Puerariae Radix had the largest number of differential components. **Conclusion:** UHPLC-Q-TOF-MS method can rapidly identify different components of three Ge-Gen Decoction granules, providing data support for the preparation process of Ge-Gen Decoction granules and laying a foundation for the quality control and clinical application of formula granules.

[Key words] UHPLC-Q-TOF-MS; Ge-Gen Decoction; compound granules; kampo granules; formula granules; differential components

葛根汤始载于东汉张仲景的《伤寒杂病论》，该方由葛根、麻黄、桂枝、白芍、炙甘草、生姜、大枣七味中药组成，以葛根为君药，具有发汗解表、生津舒筋之功效，是治疗太阳表实证的经典方剂之一。主要用于治疗风寒表证，如发热恶寒、咳嗽、头痛身疼、项背不舒等^[1-2]。现代药理研究表明，本方具有抗流感、抗炎、抗过敏、免疫调节等活性^[3]。颗粒剂是汤剂开发成方制剂的常用剂型，因此葛根汤颗粒在临床上应用广泛^[4]，包括葛根汤中药复方颗粒(FG)、配方颗粒(混冲,FGm;煎煮,FGd)和汉方颗粒(KG)3种类型。其中，中药复方颗粒作为我国传统汤剂的替代品，具有服用方便、免煎煮的特点^[5-6]。目前对复方不同剂型的研究多是比较方中若干个指标性成分的含量差异，过于片面单一，不能反映整体差异，而关于它们整体化学成分的差异分析却鲜有报道；此外，配方颗粒作为单味中药提取物的新型配药形式，用药可随证加减^[7-8]，但进行适当的煎煮与直接混冲服用是否存在化学成分的差异也尚无定论。

基于此，本研究利用 UHPLC-Q-TOF-MS 技术，以 3 种不同类型的葛根汤颗粒为研究对象，结合多元统计分析方法和相关数据库对葛根汤中药复方颗粒与汉方颗粒、配方颗粒(混冲、煎煮)的差异化学成分进行全面分析，进而揭示三者整体差异的物质基础，为葛根汤颗粒生产工艺的优化改进以及配方

颗粒的合理应用提供数据参考。

材 料

1 药物与试剂

葛根汤中药复方颗粒(山东瑞阳制药有限公司,规格:6 g·袋⁻¹,批号:20112821);葛根汤汉方颗粒(Kracie 制药株式会社,规格:1.5 g·袋⁻¹,批号:N5M597);葛根汤配方颗粒(深圳华瑞三九医药股份有限公司,葛根批号:2002002W,麻黄批号:1907006S,桂枝批号:2102004C,白芍批号:2104002W,炙甘草批号:2011017C,生姜批号:2102001C,大枣批号:2102001W)。乙腈(美国 Thermo Fisher 科技有限公司,色谱纯);甲酸(美国 Thermo Fisher 科技有限公司,质谱纯);去离子水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

2 仪器

maXis HD 型四级杆串联飞行时间高分辨质谱仪[Q-TOF-MS,德国 Bruker 有限公司,配备电喷雾离子源(ESI)、Otof Control 工作站];Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱仪(UHPLC,美国 Thermo Fisher 科技有限公司,配备 DAD 检测器、Chromleon Xpress 工作站软件);SB-5200DTD 型超声波清洗仪(宁波新芝生物科技有限公司);SQP 十万分之一电子分析天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);CENRIFUGE 5810R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

方法与结果

1 色谱条件

色谱柱:Acclaim™ RSLC 120 C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 2.2 μm; Thermo Scientific 公司),流动相:0.1%甲酸(A)-乙腈(B);梯度洗脱程序(0~8 min, 10%~45% B; 8~13 min, 45%~65% B; 13~15 min, 65%~90% B; 15~17 min, 90%~10%; 17~20 min, 10%);流速:0.3 mL·min⁻¹;检测波长:254, 210 nm;柱温:40℃;进样量:2 μL。

2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式;质量扫描范围 m/z 50~1 500;碰撞能量:30 eV;毛细管电压分别为 3 500 V(ESI⁺)和 3 200 V(ESI⁻);雾化气压:2 bar;去溶剂气温度:230℃;流速:8 L·min⁻¹。

3 供试品溶液的制备

3.1 葛根汤中药复方颗粒 取葛根汤中药复方颗

粒 10 袋,分别研细、精密称定 10 份,置于 500 mL 容量瓶中,加蒸馏水至刻度,超声 15 min,分别取上述适量原液,适度稀释,离心 15 min,取上清液备用;葛根汤汉方颗粒样品制备方法同上。

3.2 葛根汤配方颗粒混冲 按葛根汤原处方 1 d 剂量称取方中各配方颗粒(葛根 2.4 g、麻黄 1.5 g、桂枝 0.5 g、白芍 1 g、炙甘草 1 g、生姜 1.5 g、大枣 2.2 g),充分混合研磨后处理方法同上,平行制备 10 次。

3.3 葛根汤配方颗粒煎煮 按照“3.2”项方法制备 500 mL 配方颗粒混合溶液后,文火煎煮 5 min,蒸馏水补足体积,平行制备 10 次。

4 条件优化

按照上述“1”,“2”项色谱和质谱优化条件进样,分别获得正、负离子模式下分离度和峰形较优的基峰离子流图,见图 1。不同葛根汤颗粒的整体峰貌基本一致,但是峰强略有差别,并以 FGd 为例对色谱峰进行标注,峰号与表 1 差异成分编号一致。

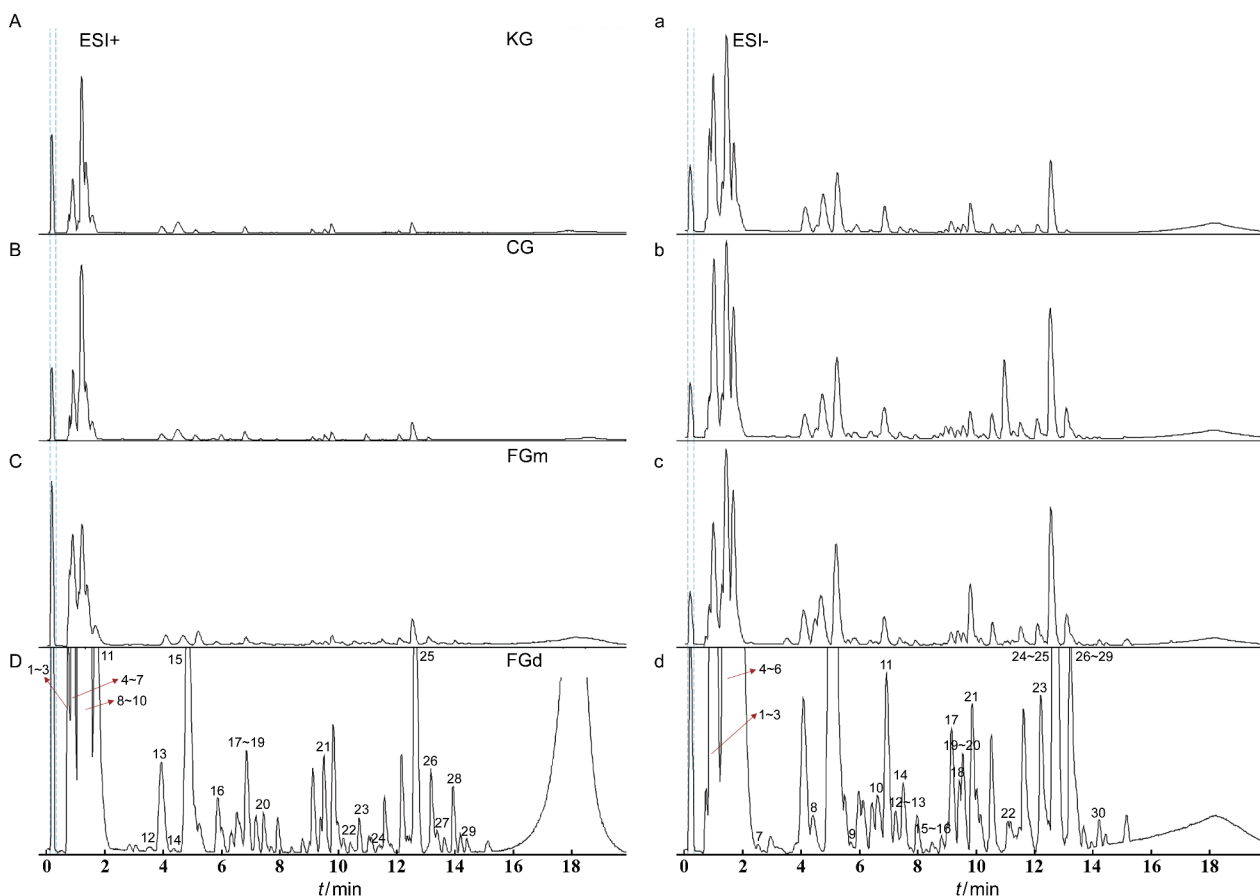


图 1 正、负离子模式下葛根汤汉方颗粒(KG,图 A,a)、复方颗粒(CG,图 B,b)、配方颗粒混冲(FGm,图 C,c)、配方颗粒煎煮(FGd,图 D,d)基峰离子流图

表 1 各差异成分汇总表

编号	t_R /min	加和 离子	分子式	检测 m/z	化合物归属	来源	KG vs CG	FGm vs CG	FGd vs FGm	主要离子碎片	鉴定 依据	
ESI ⁺	1	0.9	[M+H] ⁺	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	159.051 1	尿囊素 (allantoin)	P	↓ ^b	↓ ^b	— /	HMDB	
	2	0.9	[M+H] ⁺	C ₆ H ₆ O ₃	127.038 9	5-羟甲基糠醛 (5-hydroxy-methyl-2-furfural)	E	↑	↓ ^b	— /	[3], HMDB	
	3	0.9	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291.085 8	儿茶素 (catechin)	C	↑ ^b	↑ ^b	—	175.119 0,176.091 1	HMDB
	4	1.1	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	565.154 8	3'-羟基葛根素-木糖苷 (3'-hydroxy puerarin-xyloside)	P	↑ ^b	—	—	433.110 9,415.101 3, 283.058 9,337.069 6	[3]
	5	1.1	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	579.170 9	大豆苷元 4',7-二葡萄糖苷 (daidzein4',7-diglucoside)	P	↓	↑ ^b	↑ ^d	255.065 1,399.107 2, 417.119 1	[3]
	6	1.1	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₃ NO	152.106 9	去甲麻黄碱 (norephedrine)	E	↑ ^b	↑ ^b	↑ ^d	115.054 0,117.069 4, 134.096 1	[30]
	7	1.1	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₀ O	135.080 2	肉桂醇 (cinnamyl alcohol)	C	↓ ^b	↓ ^b	— /		HMDB
	8	1.3	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	549.160 5	葛根素-6"-O-木糖苷 (puerarin 6"-O-xyloside)	P	↓	↑ ^b	—	417.117 7,399.106 8, 381.096 1,297.075 1	[3]
	9	1.3	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₅ NO	166.122 5	麻黄碱 (ephedrine)	E	↓ ^b	↓ ^b	↑ ^d	148.111 2,133.088 2, 117.069 3,115.053 3,132.079 8	[3,30]
	10	1.3	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₇ NO	180.138 2	甲基麻黄碱 (methylephedrine)	E	↓ ^b	↓ ^b	↑ ^d	162.090 4,147.064 7, 117.069 7	[3]
	11	1.5	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	417.116 9	葛根素 (puerarin)	P	↓ ^b	↓ ^b	↑ ^d	399.106 5,363.085 2, 351.085 3,321.075 3, 307.095 2,297.074 9	[3,26]
	12	3.9	[M+Na] ⁺	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	503.150 8	芍药苷 (paeoniflorin)	L	—	↑ ^b	↓ ^d	341.099 9,219.063 9	[3,25]
	13	4.1	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	481.169 6	芍药内酯苷 (albiflorin)	L	↓ ^b	↑ ^b	↓ ^d	105.033 5,133.065 1, 197.080 6	HMDB
	14	4.5	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	417.117 2	大豆苷 (daidzin)	P	—	↑ ^b	↑ ^d	255.064 4	[3]
	15	5.1	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	179.069 9	4-甲基肉桂酸 (4-methoxycinnamic acid)	C	↓ ^b	↓	—	161.059 3,151.075 8, 133.064 7,103.053 0	MassBank
	16	5.7	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447.128 9	黄豆黄苷 (glycitin)	P	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	429.116 6,285.074 4, 411.106 6	HMDB
	17	6.7	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	579.167 9	3'-甲氧基葛根素-6"-O-β-芹糖苷 (3'-methoxy puerarin-6"-O-β-apionoside)	P	↓	—	—	351.086 1,429.108 8	[3]
	18	6.8	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.080 6	甘草素 (liquiritigenin)	G	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	147.043 4,137.023 1, 119.048 3	[3]
	19	6.9	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	551.174 7	甘草芹糖苷 (liquiritin apioside)	G	↓ ^b	↓ ^b	↓	257.079 3,419.122 4	[3,26]
	20	7.3	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.113	染料木苷 (genistin)	P	↑ ^b	↑ ^b	↑ ^d	271.058 9	[3,25]
	21	9.6	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	431.133 4	芒柄花苷 (ononin)	P	—	↓ ^a	↑ ^d	269.08	[25]
	22	10.1	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.075 5	生物素 A (biochanin A)	P	—	↑ ^b	—	270.050 3,253.049 0, 225.053 6	[3]
	23	10.9	[M+H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₂	149.059 4	肉桂酸 (cinnamic acid)	C	—	↑ ^b	↑ ^d	103.054 1,131.048 6	[27,30]

编号	t_R /min	加和离子	分子式	检测 m/z	化合物归属	来源	KG vs CG	FGm vs CG	FGd vs FGm	主要离子碎片	鉴定依据
24	11.4	[M + H] ⁺	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	585.195 6	苯甲酰芍药苷 (benzoyl paeoniflorin)	L	—	↑ ^b	↓ ^d	213.095 9, 301.109 0, 319.120 5	HMDB
25	12.1	[M + H] ⁺	C ₄₂ H ₆₀ O ₁₆	821.395	甘草皂苷 E ₂ (licoricesapogenin E ₂)	G	↑ ^b	↑ ^b	↑ ^d	645.362 0, 803.385 0	[3], HMDB
26	13.2	[M + H - H ₂ O] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	453.335 4	甘草次酸 (glycyrrhetic acid)	G	—	—	↑ ^d	/	[30], HMDB
27	13.4	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	353.137 5	甘草宁 A (gancaonin A)	G	—	—	↓ ^d	/	HMDB
28	14	[M + H] ⁺	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	277.179 5	6-姜烯酚 (6-shogaol)	ZR	—	↑ ^b	—	137.059 2, 177.090 2	[3]
29	14.5	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	357.168 8	姜烯酮 A (gingerenone A)	ZR	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	/	[27], HMDB
ESI ⁻	1	[M - H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 5	3'-羟基葛根素 (3'-hydroxypuerarin)	P	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	311.055 1, 283.065 0	[3, 26]
	2	[M - H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	169.014 1	没食子酸 (gallic acid)	L	↓ ^b	↑ ^a	↓ ^d	125.027 8	[27, 30]
	3	[M - H] ⁻	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	547.146 1	葛根素芹糖苷 (mirificin)	P	—	↑ ^b	↑ ^d	295.060 4, 325.070 5, 267.066 0	[3]
	4	[M - H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.055 6	丹皮酚 (paeonol)	L	↓ ^b	↓ ^a	↑ ^d	119.013 3	[27]
	5	[M - H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	209.045 4	5-羟基阿魏酸 (5-hydroxyferulic acid)	C	↓ ^b	↓ ^b	↑ ^d	119.048 7, 165.056 7	HMDB
	6	[M - H] ⁻	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	445.114 1	3'-甲氧基葛根素 (3'-methoxypuerarin)	P	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	325.074 8	[3]
	7	[M - H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₃	137.024 6	原儿茶醛 (protocatechualdehyde)	C	—	—	↑ ^d	/	HMDB
	8	[M - H] ⁻	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	207.066 3	咖啡酸乙酯 (ethyl caffeate)	C	—	↓ ^b	↑ ^d	135.043 9, 121.028 3, 163.039 1	HMDB, MassBank
	9	[M - H] ⁻	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	491.120 6	刺果甘草苷 A (licoagroside A)	G	↓ ^b	—	—	/	HMDB
	10	[M - H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577.156	葛根素-4-β-葡萄糖苷 (puerarin-4-β-glucoside)	P	↓ ^b	—	—	457.113 1, 429.112 5, 458.115 6, 325.059 9, 295.059 9	[3]
	11	[M - H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.119 7	甘草苷 (liquiritin)	G	↓ ^b	↓ ^a	↑ ^d	255.066 3, 135.006 1	[28]
	12	[M - H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.146 1	芦丁 (rutin)	ZJ	—	—	↑ ^d	301.030 1, 255.066 9	MassBank, HMDB
	13	[M - H] ⁻	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	631.167	没食子酰芍药苷 (galloyl-paeoniflorin)	L	—	↑ ^b	↓ ^d	613.148 8, 491.119 2	[25]
	14	[M - H] ⁻	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939.111 1	1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖 (pentagalloylglucose)	L	—	—	↓ ^c	769.083 9, 617.071 3	[25]
	15	[M - H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₃	137.024 4	4-羟基苯甲酸 5-(4-hydroxybenzoic acid)	C	—	—	↑ ^d	93.033 4	MassBank
	16	[M - H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 1	染料木素 (genistein)	P	—	↑ ^b	—	133.030 0, 225.052 1	[3]
	17	[M - H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.050 3	阿魏酸 (ferulic acid)	C	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	134.035 9	HMDB
	18	[M - H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.119 4	异甘草苷 (isoliquiritin)	G	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	255.065 1, 297.073 1	[28]
	19	[M - H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.051 1	大豆苷元 (daidzein)	P	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	197.056 5, 208.048 9, 209.056 9, 223.036 0, 224.045 3, 225.051 9	[3, 26]

编号	t_R /min	加和离子	分子式	检测 m/z	化合物归属	来源	KG vs CG	FGm vs CG	FGd vs FGm	主要离子碎片	鉴定依据
20	9.8	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.077 2	甘草查尔酮 B (licochalcone B)	G	↓ ^b	↓ ^b	—	150.030 0	[28], HMDB
21	10	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.066 1	异甘草素 (Isoliquiritigenin)	G	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	119.050 1, 135.008 9	[29]
22	11.1	[M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	983.451 9	甘草皂苷 A ₃ (licoricesapinin A ₃)	G	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	351.051 1, 821.395 4, 193.033 0	HMDB
23	12.1	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	837.393 3	甘草皂苷 G ₂ (licoricesapinin G ₂)	G	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	351.053 9, 193.052 4, 485.329 9, 352.055 9	[3, 28]
24	12.6	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.065 9	芒柄花素 (formononetin)	P/G	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	223.047 5, 195.043 9, 132.020 4	[3]
25	12.6	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.398 1	甘草酸 (glycyrrhizic acid)	G	↓ ^b	↑ ^a	↑ ^d	351.051 4, 193.031 1, 451.804 9	[28, 29]
26	13.1	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	807.418 6	甘草皂苷 B ₂ (licoricesapinin B ₂)	G	—	↑ ^b	—	351.052 5, 193.034 0, 631.372 9	HMDB
27	13.1	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.399 6	甘草皂苷 K ₂ (licoricesapinin K ₂)	G	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	351.053 0, 193.032 5, 645.361 1, 803.385 0	HMDB
28	13.3	[M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	941.513 5	枣树皂苷 IV (jujubasapinin IV)	ZJ	↓ ^b	↑ ^b	↑ ^d	615.391 6, 897.288 3, 821.396 1	HMDB
29	13.5	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆	823.413 6	甘草皂苷 J ₂ (licoricesapinin J ₂)	G	↓ ^b	↓ ^b	↑ ^d	351.052 1, 193.031 0, 647.371 5	HMDB
30	14.2	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	367.118 6	甘草香豆素 (glycy coumarin)	G	—	↑ ^b	↑ ^d	309.041	[29]

t_R : 保留时间; P: 葛根; G: 甘草; E: 麻黄; C: 桂枝; L: 白芍; ZR: 生姜; ZJ: 大枣; ↑/↓: 分别表示与 CG 相比, 该差异成分在 KG, FGm 中的含量高低, 与 FGm 相比, 差异成分在 FGd 中的含量高低; —: 无该差异成分; 与 CG 相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与 FGm 相比, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$; 质量偏差均 < 5 ppm

5 数据处理和统计分析

运用质谱配套软件 DataAnalysis 和 ProfileAnalysis 对 UHPLC-Q-TOF/MS 所采集的原始图谱数据进行滤噪、校正、峰匹配、峰对齐、去背景、归一化等处理, 得到 Bucket 列表矩阵。将列表导入 SIMCA-P (Umetrics AB 公司, version 14.1) 软件进行无监督的主成分分析 (PCA); 在 PCA 的基础上再进行有监督的正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA), 生成 OPLS-DA 得分散点图、S-plot 散点图、VIP 列表, 然后根据 t 检验 ($P < 0.05$) 和 VIP 值 ($VIP > 3$) 初步筛选差异成分的质荷比, 然后结合保留时间确定其精确质荷比, 通过 HMDB, PubChem, TCMSP, MassBank 等在线数据库对其进行定性分析, 满足质量偏差 < 5 ppm, 并利用二级碎片和文献资料等进一步鉴定, 最后通过 MeV 软件对所鉴定差异成分的半定量分析结果进行热图绘制及聚类分析。

5.1 PCA 对上述 3 种葛根汤颗粒以及混冲和煎煮的配方颗粒样品进行 PCA 分析, 发现 3 种葛根汤

颗粒的样本点各自聚为一类且彼此分离 (见图 2A 和图 2B), 说明 3 种葛根汤颗粒的成分在整体上存在差异。其中, 葛根汤中药复方颗粒与配方颗粒 (混冲) 在第一主成分方向上更为趋近, 且二者均偏离汉方颗粒样本点; 葛根汤配方颗粒煎煮前后样本点在第一主成分上也相互远离 (见图 2C 和图 2D), 说明煎煮在一定程度上影响葛根汤配方颗粒的化学成分。

5.2 相关差异成分的筛选和鉴别 为找到 3 种葛根汤颗粒以及配方颗粒混冲和煎煮后的差异成分, 在 PCA 分析的基础上进行 OPLS-DA 分析, 得到正、负离子模式下葛根汤中药复方颗粒分别与汉方颗粒、配方颗粒 (混冲) 样本以及配方颗粒混冲和煎煮样本之间的 OPLS-DA 得分散点图和 S-Plot 载荷图, 见图 3, 同时对 OPLS-DA 分析建立的统计预测模型进行 200 次置换检验。结果表明未发生过拟合, 说明建立的统计预测模型具有良好的区分能力和预测能力, 根据 $VIP > 3$, $P < 0.05$, 对差异成分的质荷比进行筛选, 利用这些差异成分的保留时间和质荷比

等信息,在 HMDB, HMDB, PubChem, TCMSP, Mass-Bank 等在线数据库中进行化合物的筛选,结合文献和二级碎片进行进一步定性鉴别。汉方葛根汤颗粒和葛根汤中药复方颗粒二者共鉴定差异化学成分 40 个,葛根汤配方颗粒(混冲)和葛根汤中药

复方颗粒共鉴定差异成分 49 个,葛根汤配方颗粒混冲和煎煮共有差异成分 45 个。如表 1 所示,本研究共鉴定 3 种葛根汤颗粒差异成分 59 个,来自该方中的君药葛根以及甘草居多,各 18 个,其次是麻黄 4 个,白芍 7 个,桂枝 9 个,生姜 2 个,大枣 2 个。

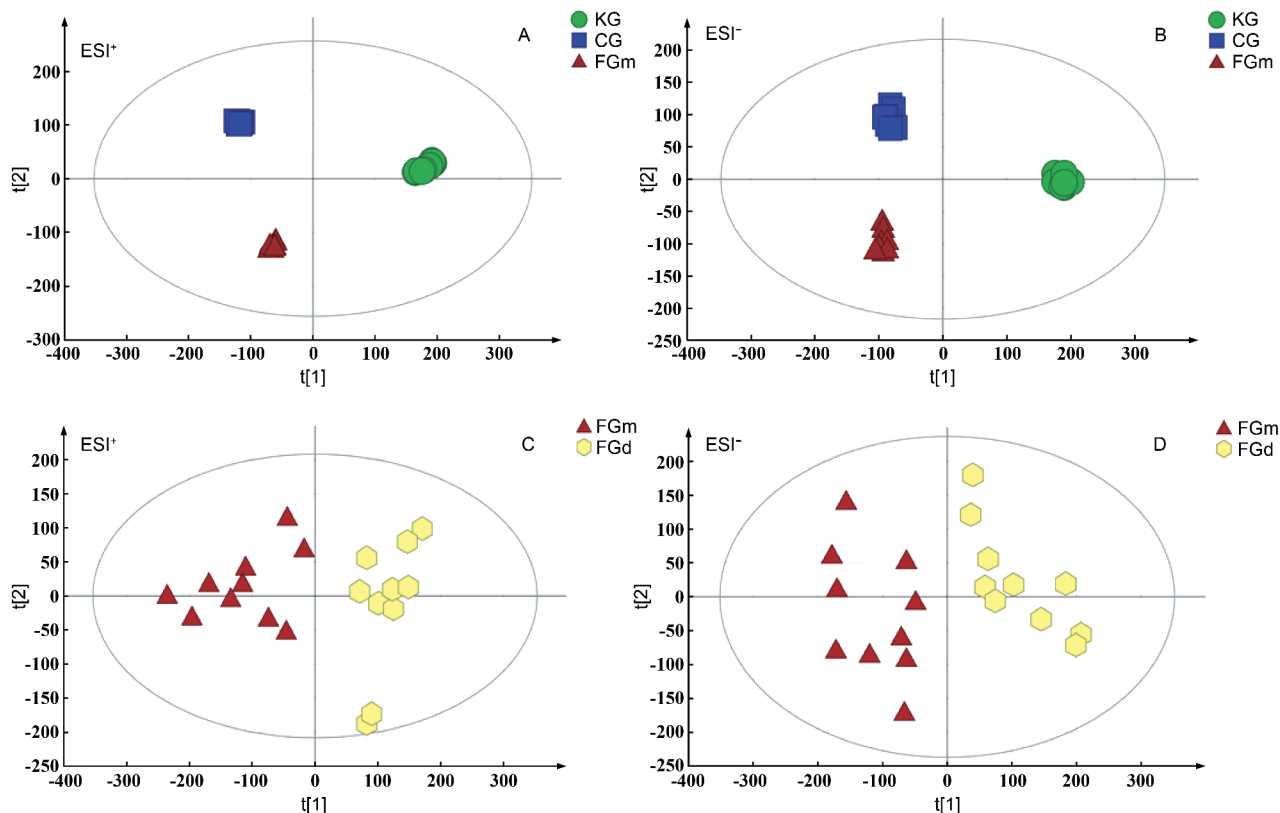
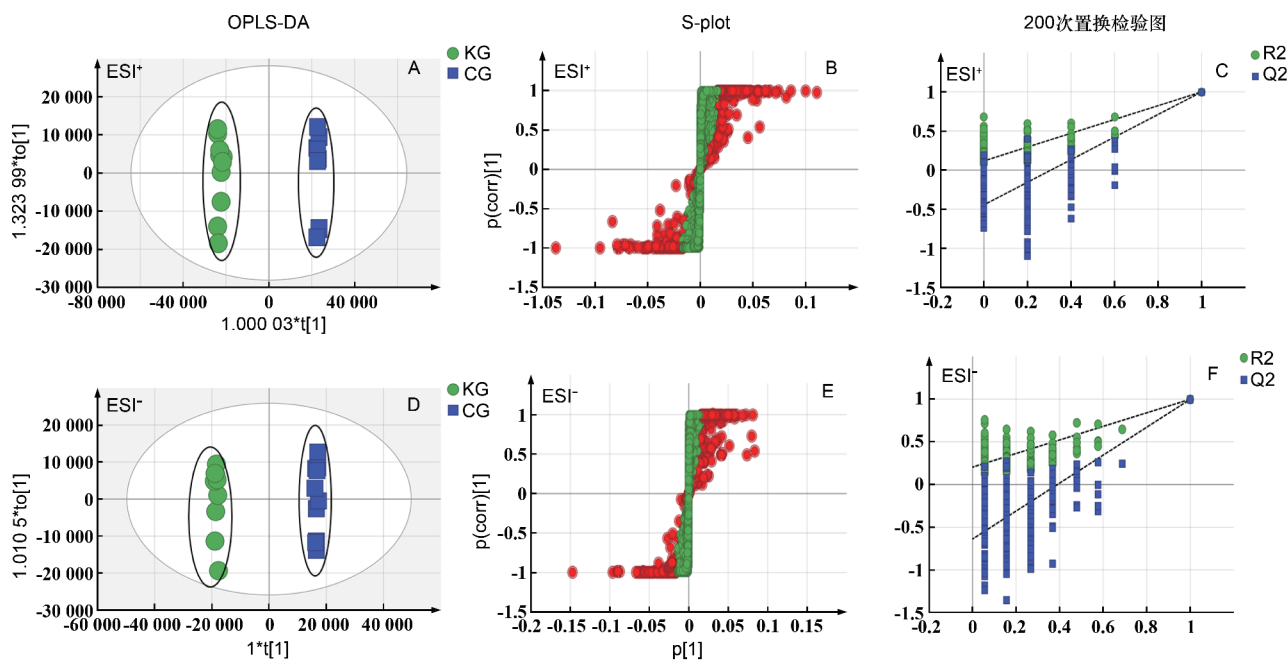
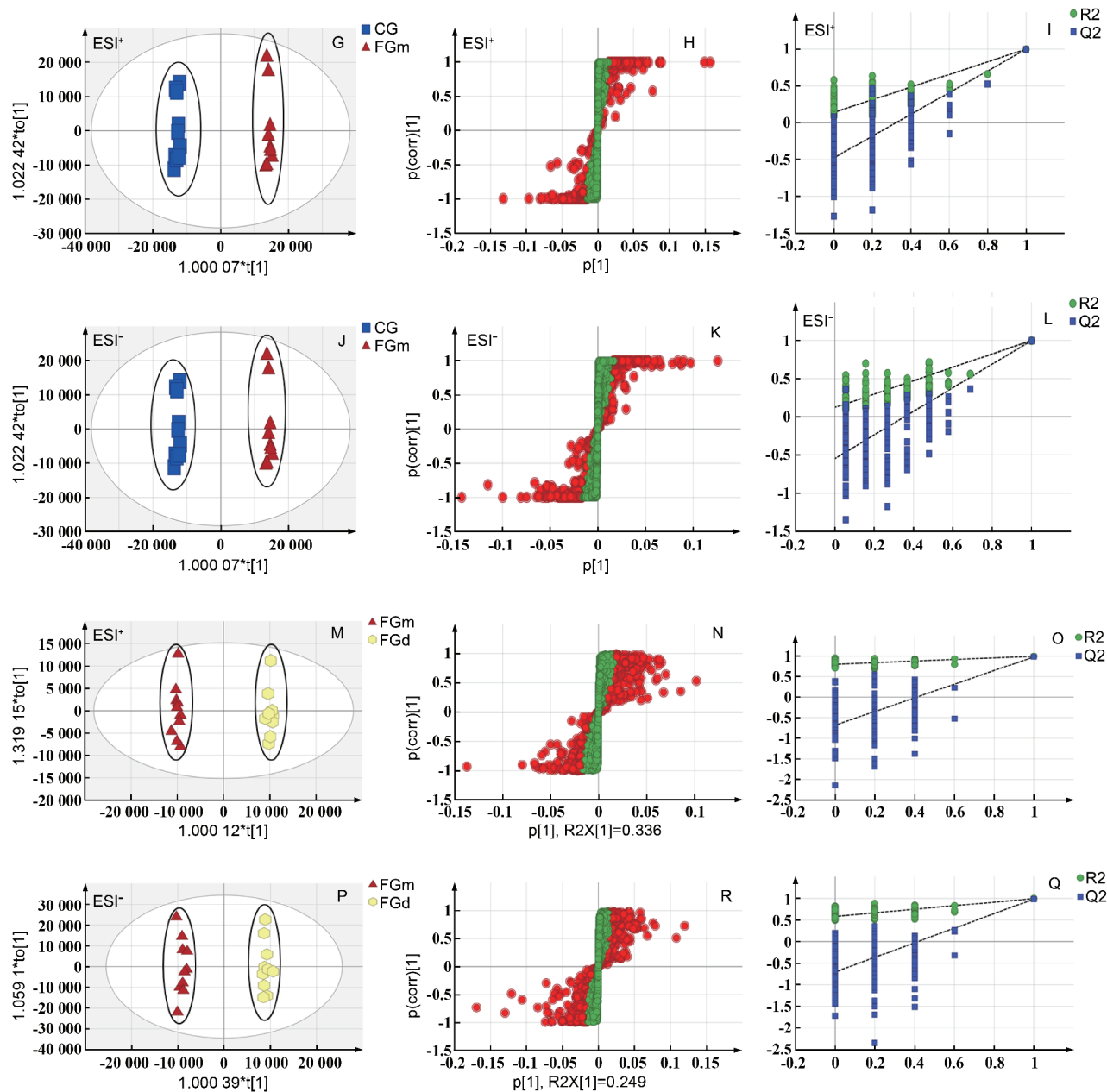


图 2 正、负离子模式下 3 种葛根汤颗粒(A,B)及配方颗粒混冲 vs 煎煮(C,D)的 PCA 得分总图





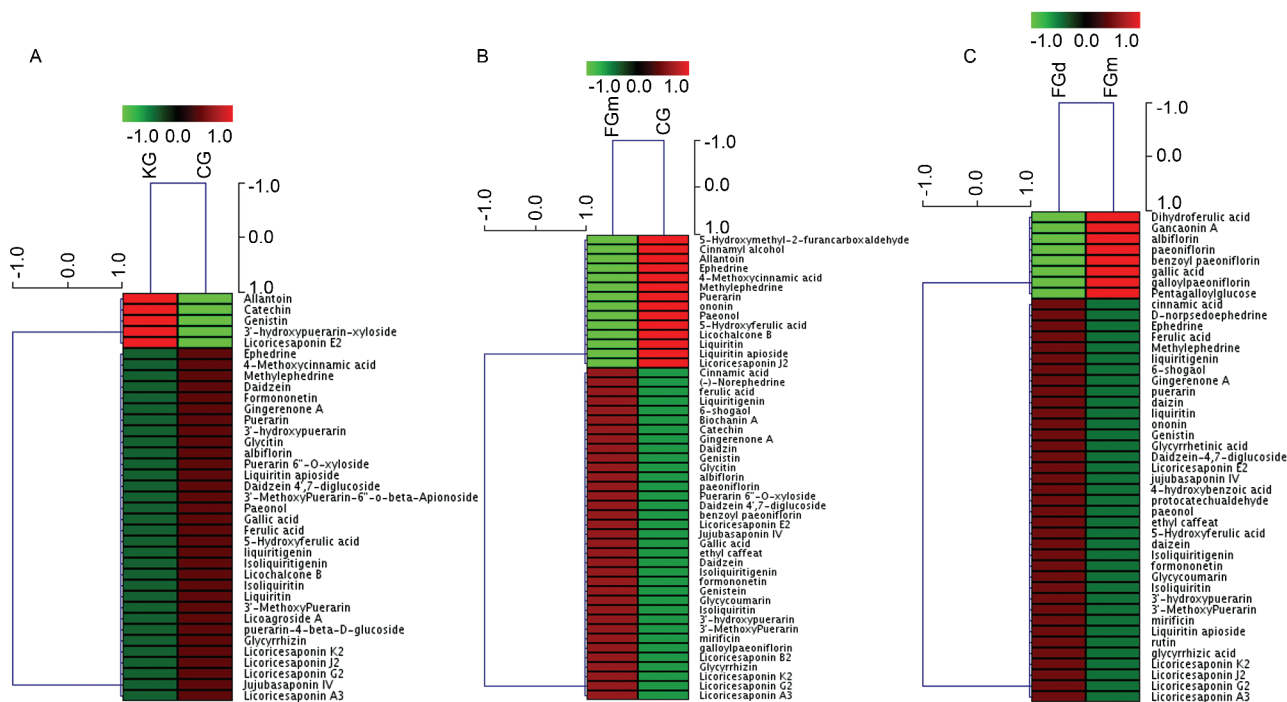
A ~ F; KG vs CG; G ~ L; FGm vs CG; M ~ Q; FGd vs FGm; ●: 潜在的差异成分

图3 正、负离子模式下的 OPLS-DA 图、S-plot 散点图和 200 次置换检验图

5.3 59 种差异成分半定量结果的热图聚类分析

使用 QuantiAnalysis 软件对各差异成分在 3 种葛根汤颗粒样本中的峰面积进行半定量分析后,导入 Mev(4.8.0 版本)软件进行热度图绘制和聚类分析,见图 4。结果表明,葛根汤汉方颗粒与中药复方颗粒相比,多数差异成分在复方颗粒中含量明

显高于前者;同理,配方颗粒(混冲)与中药复方颗粒相比,多数差异成分在配方颗粒中含量较高,但葛根素、麻黄碱、甘草苷等主要药效成分均在中药复方颗粒中含量较高;葛根汤配方颗粒煎煮与直接混冲相比,煎煮后大多数成分含量有所升高。



A ~ C: 分别代表 KG vs CG, FGm vs CG, FGd vs FGm 中的差异成分含量高低, 其中每行代表一个差异成分, 每列代表一种葛根汤颗粒, 颜色深浅代表不同差异成分在葛根汤颗粒中的含量, 绿色越浓表示含量越低, 红色越浓则越高

图 4 差异成分热图

讨 论

中药复方颗粒是我国传统汤剂改良中应用较广泛的剂型,其最大限度地保留了原有方剂的疗效特点。近年来,源于我国的汉方制剂也有良好发展,以颗粒剂居多,约占 90%^[9]。从定性和半定量结果可以看出,葛根汤汉方颗粒与中药复方颗粒有 40 个差异成分,按照葛根汤复方颗粒和汉方颗粒的日用量计算,葛根汤复方颗粒中的主要有效成分含量多高于汉方制剂,但复方颗粒剂量是汉方颗粒的 4 倍,因此单位重量汉方颗粒所含有有效成分多高于复方颗粒。查阅文献发现这与汉方制剂用剂剂量小的特点相符,汉方颗粒剂量小,用药周期长,通过药物在体内的长期累积达到治愈疾病的目的^[10]。此外,与汉方颗粒剂多以生药浸膏投料、采用膜分离、冷冻干燥等生产工艺亦有关联^[11-12]。在保证药效的基础上,改善生产工艺、减少中药资源的使用量也是我国中药复方颗粒工艺改进可借鉴的突破点。

中药复方颗粒处方固定,无法做到药随病症加减,近年来中药配方颗粒的出现弥补了这一缺点,不仅携带方便,而且可根据患者病情的轻重缓急来调整用药剂量,遵循中医临床辨证论治原则,实现个体

化治疗。但中药复方绝非中药有效成分的简单累加,使得目前配方颗粒的使用具有争议性,并且关于二者是否具有等效性以及化学成分上是否具有一致性等问题尚无确切定论^[4,13]。从本研究的结果可以看出,二者在化学成分含量上存在差异:复方中葛根素、花柄花苷、麻黄碱等主要药效成分在葛根汤复方颗粒中的含量高于配方颗粒,但差异成分中的大多数成分,如葛根中的大豆苷、大豆苷元,白芍中的主要药效成分没食子酸、白芍苷,桂枝中的肉桂酸以及甘草中的皂苷类、甘草酸等成分在配方颗粒中的含量高于复方制剂。因此,从化学成分种类和含量的角度来看,一定程度上基于配方颗粒的葛根汤在临床上应用是合理的,但配方颗粒在其他类型的复方配伍中能否发挥相当功效尚需进一步探索。此外,二者在制备过程中提取工艺、单煎、共煎等方面的不同也可能导致二者化学成分含量的差异^[14]。2021 年 11 月 1 日我国正式结束了中药配方颗粒试点的历史,配方颗粒的生产标准和质量控制更加规范^[15],加快配方颗粒的相关研究也刻不容缓。

配方颗粒作为单味中药饮片分别提取制成的新型配药形式^[20-22],未经过合煎过程。为了进一步探究葛根汤配方颗粒混冲与合煎的区别,对二者进行

了比较研究,结果表明煎煮前后色谱峰的整体峰貌相似但多数色谱峰强度有所上升,其中葛根、麻黄、甘草等药材中的主要药效成分的含量均有升高,且差异具有统计学意义,在配伍合煎过程中活性成分间可能相互影响,发生助溶、络合等物化反应,进而引起成分含量的增加^[16-17]。然而,个别差异成分经煎煮后含量有所降低,如白芍配方颗粒中芍药苷、芍药内酯苷、没食子酰芍药苷等药效成分的含量显著降低,这可能与苷类成分在高温煎煮情况下不稳定容易发生水解以及各个成分之间的相互转化有关^[18-19]。

综上所述,该方法检测到的3种葛根汤颗粒中的大多数化学成分基本相似,主要是含量差异较大,因此建立统一的颗粒剂生产工艺和质量标准势在必行;此外,对七味中药配方颗粒合煎之后含量变化有高有低,因此在临床使用时是否需要配伍颗粒合煎,还需要结合具体的配方颗粒中指标性成分的特性来确定。运用该质谱方法并未检测到糖类、多肽等大分子成分以及可能产生的新化学成分。

UHPLC-Q-TOF-MS技术具有高选择性、高灵敏度、高通量的特点^[23-30],结合多元统计方法和半定量分析可从整体上全面反映葛根汤中药复方颗粒与配方颗粒、汉方颗粒的成分差异,对3种葛根汤颗粒质量规范和临床应用具有一定参考价值,同时也为葛根汤颗粒剂的工艺改进提供一定的方向。但这些化学成分含量上的差异是否会造成3种葛根汤药效改变仍需进一步探究。

[参 考 文 献]

[1] 蔡扬帆,翁婧,林坤山,等.《伤寒论》葛根汤类方临床应用总结[J].国医论坛,2020,35(5):67-70.
 [2] 洪方,闫艳,赵雷,等.基于UHPLC-Q-TOF-MS鉴定葛根汤的入血成分及其代谢产物[J].中国中药杂志,2021,46(22):5944-5952.
 [3] YAN, YAN, . HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS analysis and HPLC quantitation of chemical constituents in traditional Chinese medicinal formula Ge-Gen Decoction[J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 80: 192-202.
 [4] 何军,朱旭江,杨平荣,等.中药配方颗粒的现状与发展新思路[J].中草药,2018,49(20):4717-4725.
 [5] 史蕙,黄蓓. HPLC对戊己丸传统汤剂与其复方、配方颗粒汤剂的特征图谱比较[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):86-94.
 [6] 文小燕,谭梅英,容丽英,等. HPLC法同时测定滋阴温阳活血颗粒中两种指标性成分的研究[J].湖南中医杂志,2019,

35(6):139-141.
 [7] 麻淑磊,邹艳君,陈晓城,等.补阳还五汤配方颗粒和传统饮片汤剂中盐酸川芎嗪含量的比较[J].中国中医药科技,2016,23(2):170-171.
 [8] 谢彦兵,谢小洁,曾海珍,等.炒白芍配方颗粒制备工艺优化[J].现代中药研究与实践,2021,35(5):58-61.
 [9] 杨平,林丹,宋菊,等.日本汉方制剂及其特点与中药新药研究的思考[J].中草药,2018,49(9):1985-1989.
 [10] 陈丽名,傅延龄,张林,等.中日韩三国中药临床用量特点比较[J].中华中医药杂志,2019,34(4):1737-1741.
 [11] 郭立玮,邢卫红,朱华旭,等.中药膜技术的“绿色制造”特征、国家战略需求及其关键科学问题与应对策略[J].中草药,2017,48(16):3267-3279.
 [12] 于翠婷,田侃,住田尚之,等.日本汉方制剂的发展现状及其经验启示[J].中草药,2018,49(2):494-498.
 [13] 张萍,牛明,谭鹏,等.中药效应近红外谱的构建及应用:以大黄配方颗粒为例[J].药学学报,2019,54(12):2162-2168.
 [14] 王杰,刘冰,周军,等.六味地黄配方颗粒与传统汤剂中6种有效成分的比较研究[J].中草药,2015,46(19):2887-2891.
 [15] 鲁萍,邓勇.中药配方颗粒行业试点20年政策梳理与优化建议[J].中草药,2022,53(4):1277-1284.
 [16] 林梦楠.中药汤剂和中药颗粒制剂的现代应用对比探究[J].中国社区医师,2019,35(34):100-101.
 [17] 赵国明.中药配方颗粒的研究进展[J].中国处方药,2019,17(6):31-32.
 [18] 王兆华,张大军.煎煮时间对白芍6种成分含量影响的研究[J].山东化工,2021,50(9):15-17.
 [19] 尹雪,孙萍,温学森.白芍中芍药苷含量影响因素研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(2):78-80.
 [20] 王青晓,王翀,刘瑞新,等.黄连传统汤剂与配方颗粒汤剂成分差异分析[J].中国新药杂志,2016,25(12):1378-1384.
 [21] 李泽娜,刘畅,李雪,等.杜仲配方颗粒HPLC指纹图谱及多成分含量测定研究[J].中国新药杂志,2022,31(7):705-712.
 [22] 甄亚钦,支雅婧,王梦,等.基于UPLC指纹图谱及多成分含量测定的2种肉苁蓉新型饮片比较研究[J].中国新药杂志,2021,30(13):1227-1235.
 [23] 王昱涵,王志萍,谭谭芳,等. UHPLC-Q-TOF-MS技术在中药及中药复方制剂研究中的应用[J].中国药师,2022,25(1):114-118.
 [24] 燕攀,贾帅龙,李森,等.基于液质联用技术的中药植化成分研究方法策略[J].药学学报,2020,55(7):1494-1503.
 [25] 唐清,郑玉莹,关敏怡,等.基于UFLC-Triple TOF MS/MS技术的补肺活血胶囊化学物质基础研究[J].中南药学,2018,16(12):1677-1683.
 [26] 孙静,周靖,罗嘉嘉,等. GC-MS和UPLC-Q-TOF-MS法测定工业大麻花叶中的化学成分[J].中国医药工业杂志,2022,53(10):1465-1481.
 [27] 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.
 [28] 董世奇,赵鹿,张东旭,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的扎冲十三味丸化学成分分析[J].中国中药杂志,2022,47(6):1546-1557.
 [29] 续艳丽,李晨曦,杨飞霞,等.基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS技术分析经典名方芍药甘草汤的化学成分[J].南京中医药大学学报,2021,37(6):938-948.
 [30] 袁梦,孙国东,刘华石,等. UPLC-Q-TOF-MS法分析大青龙汤化学成分[J].现代中药研究与实践,2022,36(1):37-44.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-09-21