

# 清上蠲痛汤标准汤剂挥发油的UPLC特征图谱建立及成分分析<sup>△</sup>

范志颖<sup>1\*</sup>, 祝倩倩<sup>2</sup>, 王协和<sup>2</sup>, 翟燕娟<sup>2</sup>, 王慧敏<sup>2</sup>, 顾杨欣<sup>2</sup>, 周海琴<sup>2</sup>, 陆兔林<sup>1</sup>, 张科卫<sup>1#</sup>, 李松<sup>2</sup>(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2. 江阴天江药业有限公司, 江苏 江阴 214434)

中图分类号 R284;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)09-1082-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.09.10



**摘要** 目的 建立清上蠲痛汤标准汤剂挥发油的特征图谱,初步推断该方中影响临床治疗效果的主要挥发油类活性成分。方法 采用水蒸气蒸馏法提取清上蠲痛汤标准汤剂中挥发油,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立15批样品的超高效液相色谱(UPLC)特征图谱并进行相似度评价;采用超高效液相色谱四极杆飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF/MS)法对标准汤剂挥发油类成分进行指认、鉴定;采用气质联用(GC-MS)法分析其挥发油类成分组成。结果 15批清上蠲痛汤标准汤剂挥发油的UPLC特征图谱的相似度在0.949~0.997之间;共得到12个共有峰,经UPLC-Q-TOF/MS鉴定主要成分为甲基丁香酚、*E*-藜本内酯、*E*-正丁烯基苯酚等。GC-MS共鉴定出23个成分,主要为3,4,5-三甲氧基甲苯、百秋李醇、*Z*-藜本内酯等。结论 建立了清上蠲痛汤标准汤剂挥发油的特征图谱,初步推断甲基丁香酚、藜本内酯、*E*-正丁烯基苯酚、百秋李醇、3,4,5-三甲氧基甲苯可能是影响清上蠲痛汤挥发油临床治疗效果的主要活性成分。

**关键词** 清上蠲痛汤;经典名方;挥发油;特征图谱;化学成分

## Establishment of UPLC characteristic chromatogram and component analysis of the volatile oil in the standard decoction of Qingshang juantong decoction

FAN Zhiying<sup>1</sup>, ZHU Qianqian<sup>2</sup>, WANG Xiehe<sup>2</sup>, ZHAI Yanjuan<sup>2</sup>, WANG Huimin<sup>2</sup>, GU Yangxin<sup>2</sup>, ZHOU Haiqin<sup>2</sup>, LU Tulin<sup>1</sup>, ZHANG Kewei<sup>1</sup>, LI Song<sup>2</sup>(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangyin Tianjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Jiangyin 214434, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To establish the characteristic chromatogram of the volatile oil in the standard decoction of Qingshang juantong decoction, and preliminarily infer the main active components of volatile oil that affect the clinical therapeutic effect. **METHODS** The volatile oil in the standard decoction of Qingshang juantong decoction was extracted by steam distillation. The ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) characteristic chromatograms of 15 batches of samples were established by the Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint (2012 edition), and the similarity evaluation was carried out. The volatile oil of standard decoction was identified by UPLC coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS). Then the volatile oil components were analyzed by GC-MS. **RESULTS** The similarities of UPLC characteristic chromatograms for volatile oil of 15 batches of Qingshang juantong decoction were between 0.949 and 0.997. A total of 12 common peaks were obtained. According to the UPLC-Q-TOF/MS, the main components were methyl eugenol, *E*-ligustilide, *E*-butylidenephthalide and so on. A total of 23 components were identified by GC-MS, which were mainly 3,4,5-trimethoxy-methylbenzene, patchouli alcohol, *Z*-ligustilide and so on. **CONCLUSIONS** The characteristic chromatograms of the volatile oil in the standard decoction of Qingshang juantong decoction is established, and it is inferred that methyl eugenol, ligustilide, *E*-butylidenephthalide, patchouli alcohol, 3,4,5-trimethoxy-methylbenzene might be the main active components affecting the clinical therapeutic effect of the volatile oil of Qingshang juantong decoction.

**KEYWORDS** Qingshang juantong decoction; classic formula; volatile oil; characteristic chromatogram; chemical constituents

2018年国家中医药管理局发布了第一批《古代经典名方目录》,清上蠲痛汤位列其中。清上蠲痛汤出自明

△基金项目 江苏省科技成果转化专项资金项目(No.BA2021018)

\*第一作者 硕士研究生。研究方向:中药制药技术与产品开发。

E-mail: fan18317539631@163.com

#通信作者 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药炮制与饮片质量。E-mail: kewei@njucm.edu.cn

代医家龚廷贤《寿世保元》(卷六)“头痛门”的第一方,由酒当归、川芎、白芷、细辛、羌活、独活、防风、菊花、蔓荆子、苍术、酒黄芩、麦冬、甘草共13味药材组成,生姜煎服,为治疗头痛的经典方剂,具有疏风散寒除湿、行气活血、通络止痛的作用。该方含挥发油类成分的药材较多,且这些挥发油类成分具有镇痛、抗炎、抗脑缺血等药

理作用<sup>[1]</sup>。如方中的酒当归、川芎、白芷、细辛、羌活等药材轻清上达,可疏风通络、松透伏邪,与该方主治头痛相符,故对清上蠲痛汤挥发油类成分进行探索和研究具有重要意义。

目前,关于清上蠲痛汤的研究多集中于临床应用以及该方水煎液中水溶性成分的指纹图谱、特征图谱、煎煮工艺与质量控制等方面<sup>[2]</sup>。虽然有学者对该方中挥发油类成分进行了相关研究,但仍侧重于方中的水溶性成分,对挥发油类成分的研究尚不够全面。鉴于此,本研究拟建立清上蠲痛汤标准汤剂挥发油的超高效液相色谱(UPLC)特征图谱,并利用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)法和气质联用(GC-MS)法分析和鉴定该方中的挥发油类成分,旨在为该方基准样品标准的制定、后续制剂工艺的研究及质量标准的建立提供借鉴。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括 Agilent 1290 型 UPLC 仪、Agilent 6530 型串联四极杆飞行时间质谱仪、8890A-7000D 型 GC-MS 仪(美国 Agilent 公司),JJ500 型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂),ME204 型万分之一电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],POMEX 型挥发油提取器(北京北玻博美玻璃有限公司),Milli-Q®IQ7005 型纯水系统(美国 Millipore 公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

甲基丁香酚对照品(批号 111642-200301,纯度 > 98.0%)购自中国食品药品检定研究院;洋川芎内酯 A 对照品(批号 ST10580120,纯度 > 98.0%)、藁本内酯对照品(批号 RS04251081,纯度 > 98.0%)均购自上海诗丹德生物技术有限公司;甲醇、乙腈、甲酸、磷酸、冰醋酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

清上蠲痛汤所用药材均购自道地产区或主产区。药材基原、药用部位、产地及采收加工均明确,药材经江阴天江药业有限公司药材鉴定高级工程师唐波鉴定均为真品。采用随机数字表法将 15 批清上蠲痛汤组方饮片进行组合,15 批饮片批次产地信息见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 Waters CORTECS C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm, 1.6 μm)色谱柱,以乙腈(A)-水(B)为流动相进行梯度洗脱(0~2 min, 25%A→34%A; 2~13 min, 34%A; 13~15 min, 34%A→35%A; 15~27 min, 35%A; 27~28 min, 35%A→25%A; 28~32 min, 25%A);柱温为 30 ℃;检测波长为 235 nm;流速为 0.3 mL/min;进样量为 0.5 μL。

### 2.2 溶液的制备

#### 2.2.1 标准汤剂

本研究根据清上蠲痛汤最佳煎煮工艺<sup>[2]</sup>,放大 6 倍进行标准汤剂的制备:取酒当归 22.38 g、川芎 22.38 g、白

表 1 15 批清上蠲痛汤样品组方饮片的批次产地信息

编号	酒当归	川芎	白芷	细辛	羌活	独活	防风	菊花	蔓荆子	麸炒苍术	酒黄芩	麦冬	甘草
S1	海东	德阳	亳州	通化	马尔康	绵阳	保定	盐城	九江	赤峰	承德	三台	定西
S2	陇南	德阳	保定	本溪	绵阳	赤峰	盐城	宜春	承德	运城	三台	兰州	
S3	定西	成都	亳州	通化	阿坝	宜昌	赤峰	嘉兴	宜春	承德	日照	三台	武威
S4	定西	眉山	保定	本溪	绵阳	巫溪	承德	盐城	九江	呼伦贝尔	日照	安州	兰州
S5	陇南	德阳	焦作	抚顺	绵阳	巫溪	保定	盐城	宜春	赤峰	日照	安州	赤峰
S6	陇南	眉山	保定	抚顺	阿坝	绵阳	保定	盐城	九江	承德	运城	安州	定西
S7	海东	眉山	焦作	本溪	小金	绵阳	承德	盐城	景德镇	赤峰	承德	安州	兰州
S8	定西	眉山	焦作	本溪	绵阳	恩施	承德	盐城	宜春	承德	日照	安州	白银
S9	海东	成都	亳州	通化	松潘	巫溪	赤峰	盐城	宜春	呼伦贝尔	承德	三台	定西
S10	定西	德阳	亳州	本溪	绵阳	恩施	赤峰	黄冈	景德镇	赤峰	日照	三台	兰州
S11	陇南	德阳	保定	抚顺	阿坝	宜昌	承德	盐城	九江	承德	运城	三台	定西
S12	陇南	成都	焦作	通化	小金	恩施	保定	黄冈	景德镇	呼伦贝尔	运城	三台	定西
S13	海东	成都	焦作	抚顺	小金	绵阳	保定	黄冈	景德镇	呼伦贝尔	承德	三台	武威
S14	海东	眉山	亳州	通化	松潘	巫溪	承德	黄冈	九江	赤峰	运城	三台	鄂尔多斯
S15	海东	成都	保定	抚顺	阿坝	十堰	赤峰	黄冈	景德镇	呼伦贝尔	承德	三台	花盆

芷 22.38 g、细辛 6.72 g、羌活 22.38 g、独活 22.38 g、防风 22.38 g、菊花 11.22 g、蔓荆子 11.22 g、麸炒苍术 22.38 g、酒黄芩 33.60 g、麦冬 22.38 g、甘草 6.72 g,粉碎(过 4 目筛网),加水 2 438 mL,浸泡 30 min,煮沸后再煎煮 20 min,200 目筛趁热滤过;药渣加水 1 896 mL,煮沸后再煎煮 15 min,200 目筛趁热滤过;合并 2 次滤液,即得。

#### 2.2.2 供试品溶液

(1) 全方供试品溶液。将“2.2.1”项下制备的清上蠲痛汤标准汤剂趁热转移至 5 000 mL 圆底烧瓶中,加入玻璃珠数粒,连接挥发油提取装置,自收集器上端加水使其充满挥发油测定器的刻度部分,并溢流入烧瓶中,电热套加热并保持微沸状态,回流 4 h 后冷却;由提取器上端加入乙酸乙酯 1 mL,收集乙酸乙酯层至 2 mL 量瓶中,用乙酸乙酯洗涤冷凝管及挥发油提取器内壁,洗液并入同一量瓶中,加乙酸乙酯至刻度,摇匀,即得清上蠲痛汤标准汤剂挥发油。从已收集的挥发油中精密吸取 100 μL,置于 2 mL 量瓶中,加甲醇稀释并定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得全方供试品溶液(即标准汤剂挥发油)。

(2) 单味药供试品溶液。分别按“2.2.1”项下称样量及方法制备单味药标准汤剂,再按“2.2.2(1)”项下方法制备单味药供试品溶液。

(3) 阴性制剂供试品溶液。分别按“2.2.1”项下称样量及方法制备各单味药的缺味阴性标准汤剂,再按“2.2.2(1)”项下方法制备成各缺味阴性制剂供试品溶液。

## 2.3 清上蠲痛汤标准汤剂挥发油 UPLC 特征图谱的建立及分析

### 2.3.1 方法学考察

(1) 精密度试验。取清上蠲痛汤(编号 S1)饮片,先按“2.2.1”项下方法制备标准汤剂,再按“2.2.2(1)”项下方法制备全方供试品溶液,最后按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次。以稳定性、分离度好的 8 号峰作为参照峰(S),计算得到各特征峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.05%、相对峰面积的 RSD 均 < 0.02%(n=6),表明方法精密度良好。

(2)重复性试验。取清上蠲痛汤(编号S1)饮片,先按“2.2.1”项下方法制备标准汤剂,再按“2.2.2(1)”项下方法平行制备6份全方供试品溶液,最后按“2.1”项下色谱条件进样测定。以8号峰为参照峰(S),计算得到各特征峰相对保留时间的RSD均<0.03%、相对峰面积的RSD均<0.95%(n=6),表明方法重复性良好。

(3)稳定性试验。取清上蠲痛汤(编号S1)饮片,先按“2.2.1”项下方法制备标准汤剂,再按“2.2.2(1)”项下方法制备全方供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定。以8号峰为参照峰(S),计算得到各特征峰相对保留时间的RSD均<0.17%、相对峰面积的RSD均<2.95%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

### 2.3.2 UPLC特征图谱建立及相似度评价

取15批清上蠲痛汤(编号S1~S15)饮片,先按“2.2.1”项下方法制备标准汤剂,再按“2.2.2(1)”项下方法制备全方供试品溶液,最后按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,以S2样品的特征图谱作为参照图谱,设置时间窗宽度为0.1 min,采用中位数法,进行多点校正和Mark峰匹配,得到15批样品的特征图谱及对照特征图谱(R);以对照特征图谱(R)为参照,计算15批清上蠲痛汤样品的相似度。结果显示,共得到12个共有峰;15批样品的相似度在0.949~0.997之间,相似度较高。结果见图1。

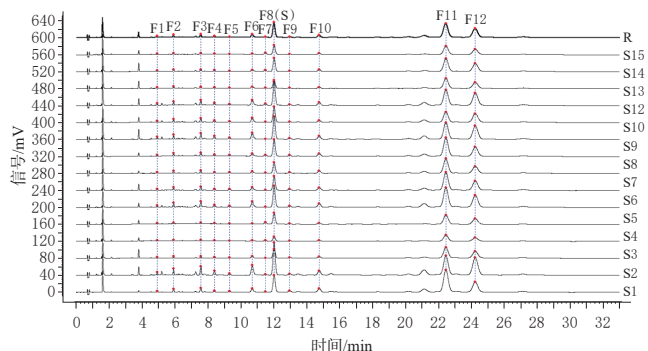


图1 15批清上蠲痛汤标准汤剂挥发油的UPLC叠加特征图谱

### 2.3.3 共有峰的归属

取清上蠲痛汤(编号S2)饮片,按“2.2.1”项下方法制备标准汤剂,再按“2.2.2(1)”项下方法制备全方供试品溶液;取酒当归、川芎、白芷、细辛、羌活、独活、防风、菊花、蔓荆子、麸炒苍术、生姜11味含挥发油类成分的饮片,按“2.2.2(2)”项下方法制备各单味药供试品溶液,并按“2.2.2(3)”项下方法制备缺味的各阴性制剂供试品溶液。取上述3种溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。通过对比3种溶液的色谱图发现,清上蠲痛汤标准汤剂挥发油类成分的12个共有峰主要来源于当归、川芎、羌活、细辛4味饮片。其中,1、4号峰来源于羌活,2、3、5、

7、8号峰来源于细辛,1、4、10、11、12号峰来源于当归,1、9、10、11、12号峰来源于川芎、羌活、细辛、当归,详见图2;而白芷、独活、防风、菊花、蔓荆子、苍术、生姜在本色谱条件下未有相应色谱峰归属信息。

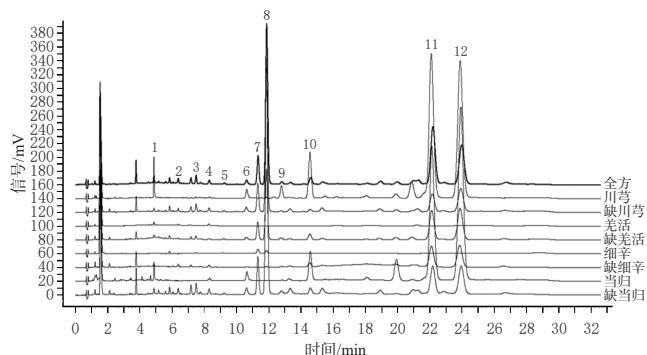


图2 清上蠲痛汤标准汤剂挥发油类成分的UPLC共有峰归属

## 2.4 UPLC特征图谱中共有峰的UPLC-Q-TOF/MS鉴定

### 2.4.1 检测条件

色谱条件同“2.1”项。质谱检测条件如下:离子源为电喷雾离子源(ESI);干燥气温度为300℃;流量为8 mL/min;雾化器压力为35 psi;正离子模式下毛细管电压为4 000 V,毛细管出口电压为175 V,锥孔电压为65 V;采用高分辨模式进行数据采集,质荷比(*m/z*)为100~2 000;雾化压力为5 psi。

### 2.4.2 共有峰鉴定

取“2.2.1(1)”项下全方供试品溶液(编号S2),采用UPLC-Q-TOF/MS法,按“2.4.1”项下条件进样检测,根据质谱检测数据结合参考文献和化学数据库对清上蠲痛汤标准汤剂挥发油类成分共有峰进行快速鉴定。结果见表2。

表2 清上蠲痛汤标准汤剂中挥发油类成分共有峰UPLC-Q-TOF/MS鉴定结果

峰号	保留时间/min	化合物	分子式	<i>m/z</i> (正离子模式)	参考文献
1	4.498	氢化桂皮酸	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	151.075 3[M+H] <sup>+</sup>	[3]
2	5.492	3,4,5-三甲氧基甲苯	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	183.101 2[M+H] <sup>+</sup>	[3]
3	7.231	2,3,5-三甲氧基甲苯	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	183.100 9[M+H] <sup>+</sup>	[3]
4	8.076	洋川芎内酯F	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	207.101 5[M+H] <sup>+</sup>	[4]
5	9.169	洋川芎内酯G	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	209.114 6[M+H] <sup>+</sup>	[5]
6	10.528	异香草醛	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	153.054 7[M+H] <sup>+</sup>	[6]
7	11.257	细辛脑	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	209.117 0[M+H] <sup>+</sup>	[7]
8	11.853	甲基丁香酚	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	179.106 1[M+H] <sup>+</sup>	[8]
9	12.864	洋川芎内酯A	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	193.122 4[M+H] <sup>+</sup>	[9]
10	14.835	Z-藜本内酯	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	191.106 9[M+H] <sup>+</sup>	[10]
11	22.920	E-藜本内酯	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	191.106 7[M+H] <sup>+</sup>	[10]
12	24.825	E-正丁烯基苯酚	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	191.106 6[M+H] <sup>+</sup>	[10]

## 2.5 GC-MS法分析清上蠲痛汤标准汤剂挥发油类成分

### 2.5.1 供试品溶液制备

取清上蠲痛汤(编号S2)饮片,按“2.2.2(1)”项下方法制备清上蠲痛汤标准汤剂挥发油。精密吸取挥发油

100  $\mu\text{L}$ ,置于2 mL容量瓶中,加甲醇稀释并定容,加适量无水硫酸钠脱水,即得。

### 2.5.2 检测条件

色谱柱为HP-5MS毛细管色谱柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu\text{m}$ );进样量为1  $\mu\text{L}$ ;分流比为10:1;进样口温度为240  $^{\circ}\text{C}$ ;升温程序为起始温度70  $^{\circ}\text{C}$ 、保持1 min,以5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至150  $^{\circ}\text{C}$ 、保持1 min,再以5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至160  $^{\circ}\text{C}$ 、保持2 min,接着以2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至180  $^{\circ}\text{C}$ 、保持1 min,最后以12  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至230  $^{\circ}\text{C}$ 、保持4 min;载气为氦气;进样口温度为240  $^{\circ}\text{C}$ ;离子源为电子轰击离子源(EI);电子能量为70 eV;接口温度为230  $^{\circ}\text{C}$ ;扫描范围为50~550 amu。

### 2.5.3 清上罍痛汤标准汤剂挥发油类成分的分析

取“2.5.1”项下供试品溶液,采用GC-MS法,按“2.5.2”项下条件进行分析,通过Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0化学工作站NIST17.L谱库检索,从清上罍痛汤标准汤剂挥发油中共鉴定出23个成分,占总含量的82.66%。通过Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0化学工作站数据处理系统,按峰面积归一化法计算这23个成分的相对百分含量。结果显示,主要化学成分有3,4,5-三甲氧基甲苯、百秋李醇、*Z*-藁本内酯,分别占挥发油总量的9.19%、19.10%、21.10%。结果见表3。

表3 清上罍痛汤标准汤剂挥发油类成分的GC-MS鉴定结果

编号	保留时间/min	峰面积	相对百分含量/%	化合物	分子式
1	8.380	6 131 715.74	0.67	4-萜烯醇	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O
2	11.269	8 755 318.56	0.95	3,5-二甲氧基甲苯	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
3	13.565	30 983 514.89	3.37	黄樟素	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>
4	14.203	24 576 815.39	2.67	甲基丁香酚	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
5	17.126	84 503 803.06	9.19	3,4,5-三甲氧基甲苯	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>
6	17.309	19 316 624.60	2.10	肉豆蔻醚	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>
7	18.727	3 526 453.81	0.38	槐香醇	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O
8	21.247	18 221 328.48	1.98	桉油烯醇	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
9	22.233	6 613 291.93	0.72	$\beta$ -杜松烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
10	24.036	12 783 884.04	1.39	(1 <i>R</i> ,3 <i>aR</i> ,4 <i>R</i> ,7 <i>R</i> )-1,2,3,3 <i>a</i> ,4,5,6,7-八氢-1,4-二甲基-7-(1-甲基乙烯基)-萹	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
11	24.338	59 670 682.20	6.49	$\beta$ -桉叶醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
12	24.789	175 537 064.10	19.10	百秋李醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
13	25.131	8 565 773.96	0.93	<i>Z</i> -亚丁基苯酚	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>
14	25.517	43 150 847.12	4.69	红没药醇	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
15	25.820	3 416 121.42	0.37	洋川芎内酯A	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
16	27.354	22 837 655.39	2.48	洋川芎内酯	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
17	28.039	193 903 529.30	21.10	<i>Z</i> -藁本内酯	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
18	28.286	7 688 408.24	0.84	异水菖蒲二醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>
19	30.261	3 733 812.19	0.41	<i>E</i> -藁本内酯	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
20	35.431	2 579 348.34	0.28	phenylphosphonic acid,2,4,4-trimethylpentyl ethyl ester	C <sub>16</sub> H <sub>27</sub> O <sub>3</sub> P
21	36.412	3 274 373.60	0.36	2-(2-hydroxy-cyclohexylamino)-pyridine, <i>N</i> -oxide	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
22	37.576	4 507 583.78	0.49	7-isopropyl-1,1,4 <i>a</i> -trimethyl-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,9,10,10 <i>a</i> -octahydrophenanthrene	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub>
23	38.899	15 486 165.39	1.68	蛇床子素	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>

## 3 讨论

### 3.1 处方量的选择及标准汤剂挥发油的提取

清上罍痛汤原处方单味药量较少,挥发油难以提取,因此本研究将最佳煎煮工艺放大6倍,进行标准汤剂制备与挥发油收集。由于挥发油研究是针对清上罍痛汤标准汤剂展开的,因此在制备全方供试品溶液时先制备标准汤剂,继而趁热提取水煎液中的挥发油。

### 3.2 定性分析方法的选择

本研究采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》确定UPLC特征图谱的共有峰,再通过UPLC-Q-TOF/MS法进行共有峰指认。由于在正离子模式下清上罍痛汤标准汤剂中挥发油类成分的出峰数量较多、峰形好、基线较稳定、分离度好,因此最终选择在正离子模式下检测。笔者前期通过与对照品比对,指认出UPLC特征图谱12个共有峰中的8号峰为甲基丁香酚、9号峰为洋川芎内酯A、11号峰为藁本内酯。为了更加全面地表征清上罍痛汤标准汤剂挥发油类成分,本研究采用UPLC法建立清上罍痛汤标准汤剂挥发油特征图谱,辅以GC-MS法对清上罍痛汤标准汤剂挥发油类成分进行定性分析。

### 3.3 色谱及样品制备条件优化

#### 3.3.1 UPLC色谱条件优化

本研究前期通过比较不同波长(235、245、255 nm)发现,检测波长为235 nm时各化合物的响应值最大,色谱峰分离较好。此外,本研究还比较了甲醇-0.05%磷酸溶液、乙腈-0.05%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.1%冰醋酸溶液、乙腈-水6种不同流动相体系对色谱峰分离效果的影响,最终根据出峰数量及响应值情况等,选择乙腈-水为本研究的流动相。

#### 3.3.2 GC色谱条件优化及稀释溶剂选择

由于清上罍痛汤中挥发油类成分比较复杂,因此本研究选择程序升温,以提高各挥发油类成分的分离度和分辨率。本研究前期比较了不同稀释溶剂(乙酸乙酯、正己烷、甲醇)的分离效果,最终选择了响应值最大、分离度最好的甲醇作为稀释溶剂。此外,本研究还考察了HP-5 MS、DB WAX、DB1701这3种毛细管色谱柱的分离效果,最终选择HP-5 MS毛细管色谱柱。

### 3.4 活性成分分析

本研究建立了UPLC特征图谱,并采用UPLC-Q-TOF/MS法对15批清上罍痛汤标准汤剂挥发油的12个共有峰进行了鉴定。由图1可知,其主要化学成分有甲基丁香酚(8号峰)、*E*-藁本内酯(11号峰)、*E*-正丁烯基苯酚(12号峰)。其中甲基丁香酚具有抗炎、镇痛、抑菌的作用<sup>[11]</sup>; *E*-藁本内酯具有抗炎、保护脑血管的作用<sup>[12]</sup>; *E*-正丁烯基苯酚作为苯酚类成分,具有神经保护作用<sup>[13]</sup>。在清上罍痛汤标准汤剂挥发油类成分的GC-MS检测

中,发现其主要化学成分有3,4,5-三甲氧基甲苯、百秋李醇、Z-藁本内酯。其中,3,4,5-三甲氧基甲苯具有抗炎、镇痛的药理作用<sup>[14]</sup>,百秋李醇具有抗炎、抗菌、镇静、抗动脉粥样硬化、调节免疫功能的生物活性<sup>[15]</sup>,Z-藁本内酯具有抗脑缺血、保护神经的作用<sup>[16]</sup>。

综上所述,本研究选择道地产区或主产区的代表性样品随机组方进行标准汤剂挥发油的研究,建立的UPLC-Q-TOF/MS、GC-MS及UPLC特征图谱定性分析方法较为全面地表征了清上蠲痛汤标准汤剂挥发油中的化学成分。通过分析可初步推测,甲基丁香酚、藁本内酯、E-正丁烯基苯酚、百秋李醇、3,4,5-三甲氧基甲苯可能是影响清上蠲痛汤挥发油临床治疗效果的主要活性成分。

(利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突)

## 参考文献

- [1] 张晓娟,张燕丽,左冬冬. 川芎的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(6):128-133.  
ZHANG X J, ZHANG Y L, ZUO D D. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. Inf Tradit Chin Med, 2020, 37(6):128-133.
- [2] 王慧敏,祝倩倩,翟燕娟,等. 经典名方清上蠲痛汤的煎煮工艺对其指标成分转移率的影响[J]. 中国现代中药, 2022, 24(10):1969-1974.  
WANG H M, ZHU Q Q, ZHAI Y J, et al. Effect of decocting process on transfer rate of index components in Qing-shang juantong decoction[J]. Mod Chin Med, 2022, 24(10):1969-1974.
- [3] 中国科学院上海有机化学研究所. 化学专业数据库[DB/OL].[2023-09-10].<https://organchem.csdb.cn>.  
Shanghai Institute of Organic Chemistry of CAS. Chemistry database[DB/OL].[2023-09-10].<https://organchem.csdb.cn>.
- [4] WANG Y L, LIANG Y Z, CHEN B M. High-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry for analysis of *Angelica sinensis*[J]. Phytochem Anal, 2007, 18(4):265-274.
- [5] ZHANG Q Q, WANG M L, WANG Q, et al. Characterization of the potential new phthalides in *Ligusticum chuanxiong* Hort. using ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time of flight tandem mass spectrometry[J]. J Sep Sci, 2017, 40(10):2123-2130.
- [6] 郭培,郎拥军,张国桃. 羌活化学成分及药理活性研究进展[J]. 中成药, 2019, 41(10):2445-2459.  
GUO P, LANG Y J, ZHANG G T. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Notopterygium incisum*[J]. Chin Tradit Pat Med, 2019, 41(10):2445-2459.
- [7] OH J, HWANG I H, KIM D C, et al. Anti-listerial compounds from *Asari Radix*[J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(9):1339-1345.
- [8] 刘芳馨,黄鑫,张涛,等. HPLC-FLD法测定北细辛药材中甲基丁香酚的含量[J]. 人参研究, 2021, 33(5):12-14.  
LIU F X, HUANG X, ZHANG T, et al. Determination of methyleugenol in North *Asarum heterotropoides* by HPLC-FLD[J]. Ginseng Res, 2021, 33(5):12-14.
- [9] LI S L, CHAN S S, LIN G, et al. Simultaneous analysis of seventeen chemical ingredients of *Ligusticum chuanxiong* by on-line high performance liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry[J]. Planta Med, 2003, 69(5):445-451.
- [10] 杨帆,肖远胜,章飞芳,等. 当归化学成分的HPLC-MS/MS分析[J]. 药学学报, 2006, 41(11):1078-1083.  
YANG F, XIAO Y S, ZHANG F F, et al. High performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis of *Angelicacae Sciensis Radix*[J]. Acta Pharm Sin, 2006, 41(11):1078-1083.
- [11] 杨华,徐凤,万丹,等. 甲基丁香酚镇痛抗炎作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(3):292-297.  
YANG H, XU F, WAN D, et al. Study of antinociceptive and anti-inflammatory effect and antinociceptive mechanism of methyleugenol[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2017, 28(3):292-297.
- [12] 范月盈,邓翠莉,张力升,等. 基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨当归挥发油改善血管性痴呆的作用机制[J]. 中药新药与临床药理, 2023, 34(8):1117-1128.  
FAN Y Y, DENG C L, ZHANG L S, et al. Exploration of the mechanism of volatile oil of *Angelicae Sinensis Radix* in improving vascular dementia based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2023, 34(8):1117-1128.
- [13] 朱欢,刘露丝,熊亮,等. 当归油化学成分及其神经保护作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(9):1477-1483.  
ZHU H, LIU L S, XIONG L, et al. Constituents of *Angelicacae Sciensis Radix* oil and their neuroprotective effects[J]. Nat Prod Res Dev, 2020, 32(9):1477-1483.
- [14] LI C, XU F, XIE D M, et al. Identification of absorbed constituents in the rabbit plasma and cerebrospinal fluid after intranasal administration of *Asari Radix et Rhizoma* by HS-SPME-GC-MS and HPLC-APCI-IT-TOF-MS<sup>n</sup>[J]. Molecules, 2014, 19(4):4857-4879.
- [15] HU G Y, PENG C, XIE X F, et al. Availability, pharmacetics, security, pharmacokinetics, and pharmacological activities of patchouli alcohol[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017:4850612.
- [16] PENG H Y, DU J R, ZHANG G Y, et al. Neuroprotective effect of Z-ligustilide against permanent focal ischemic damage in rats[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(2):309-312.

(收稿日期:2023-12-12 修回日期:2024-04-05)

(编辑:林静)