

## HPLC 法测定参乌益肾片中 8 种成分及其化学计量学综合评价

张蕊<sup>1</sup>, 徐延昭<sup>2</sup>, 张静<sup>1</sup>, 许保海<sup>1</sup>

1. 北京积水潭医院 中药房, 北京 100035

2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

**摘要:** **目的** 建立 HPLC 法同时测定参乌益肾片中  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷 8 种成分, 联合化学计量学方法对参乌益肾片的产品质量进行综合评价。**方法** 采用 Sepax Bio-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); 以乙腈-0.1% 甲酸进行梯度洗脱; 检测波长分别为 250 nm (0~20 min 测定  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮和 25S-牛膝甾酮)、330 nm (20~60 min 测定大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷); 柱温 30  $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10  $\mu$ L。采用聚类分析、主成分分析和偏最小二乘法-判别分析法对 8 种指标成分检测结果相关性进行分析评价。**结果**  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷分别在 1.47~36.75、0.66~16.50、0.74~18.50、5.80~145.00、15.77~394.25、4.58~114.50、1.29~32.25、8.78~219.50  $\mu$ g/mL 有良好的线性关系; 平均回收率分别为 97.78%、96.90%、97.96%、99.67%、100.01%、99.54%、98.03%、100.11%, RSD 值分别为 1.17%、0.82%、1.48%、0.93%、0.77%、0.69%、1.13%、0.65%。成分 8 (2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷 VIP=1.503)、成分 4 (大车前苷 AVIP=1.404)、成分 5 (毛蕊花糖苷 VIP=1.274)、成分 1 ( $\beta$ -蜕皮甾酮 VIP=1.030) 是影响参乌益肾片样品质量的关键成分。**结论** 建立的方法简便快捷、准确可靠, 可用于参乌益肾片中多指标成分的质量综合评价模式。

**关键词:** 参乌益肾片;  $\beta$ -蜕皮甾酮; 25R-牛膝甾酮; 大车前苷; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘法-判别分析

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2022)05-0976-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.05.008

## Determination of eight components in Shenwu Yishen Tablets by HPLC and comprehensive evaluation of chemometrics

ZHANG Rui<sup>1</sup>, XU Yan-zhao<sup>2</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, XU Bao-hai<sup>1</sup>

1. TCM Pharmacy, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method for simultaneous determination of  $\beta$ -ecdysterone, 25R-inokosterone, 25S-inokosterone, plantamajoside, verbascoside, isoacteoside, calceolarioside B, and 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside, and to evaluate the comprehensive quality of Shenwu Yishen Tablets by chemometrics analysis. **Methods** The separation was carried out on Sepax Bio-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m). The mobile phase consisted of acetonitrile - 0.1% formic acid with gradient elution. The detection wavelengths were set at 250 nm for  $\beta$ -ecdysterone, 25R-inokosterone, and 25S-inokosterone, and 330 nm for plantamajoside, verbascoside, isoacteoside, calceolarioside B, and 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside. Temperature of column was set at 30  $^{\circ}$ C, the flow rate was 1.0 mL/min, and the volume of injection was 10  $\mu$ L. The chemometrics method was used to analyze and evaluate the correlation of the detection results of eight index components. **Results** There were good linear relationships of  $\beta$ -ecdysterone, 25R-inokosterone, 25S-inokosterone, plantamajoside, verbascoside, isoacteoside, calceolarioside B, and 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside within the ranges of 1.47 — 36.75, 0.66 — 16.50, 0.74 — 18.50, 5.80 — 145.00, 15.77 — 394.25, 4.58 — 114.50, 1.29 — 32.25, and 8.78 — 219.50  $\mu$ g/mL, whose average recoveries and RSD were 97.78% (1.17%), 96.90% (0.82%), 97.96% (1.48%), 99.67% (0.93%), 100.01% (0.77%), 99.54% (0.69%), 98.03% (1.13%), and 100.11% (0.65%), respectively.

收稿日期: 2022-02-28

基金项目: 北京市中医药管理局第二批中药骨干人才培养项目 (京中医科学[2018]213 号)

作者简介: 张蕊 (1984—), 男, 北京人, 副主任药师, 硕士, 从事中药临床药学、医院制剂及协定处方研究。E-mail: fv1280075@163.com

Through chemometrics analysis, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside (VIP = 1.503), plantamajoside (VIP = 1.404), verbasoside (VIP = 1.274), and  $\beta$ -ecdysterone (VIP = 1.030) were the differential markers affecting the quality of Shenwuyishen Tablets. **Conclusion** The method is simple and accurate, which can be used for quality evaluation of multiple index components in Shenwu Yishen Tablets.

**Key words:** Shenwu Yishen Tablets;  $\beta$ -ecdysterone; 25R-inokosterone; plantamajoside; cluster analysis; principal component analysis; partial least squares discriminant analysis

参乌益肾片由保肾甲丸、保肾乙丸研发而来<sup>[1]</sup>, 由怀牛膝、车前子、制何首乌、太子参等 12 味中药加工而成, 补肾健脾、活血利湿, 主要用于改善慢性肾小球肾炎所致的代偿期、失代偿期和衰竭期慢性肾衰竭, 非透析患者、气阴两虚兼浊证患者出现恶心、呕吐、食少纳呆、口干咽燥、大便干结等等临床病症的治疗。研究表明参乌益肾片能延缓慢性肾脏病 4~5 期非透析脾肾气虚证患者肾功能下降和慢性肾脏病进展的速度, 逆转部分患者肾功能进展, 降低疾病进展的风险因素, 减轻微炎症状态和抗肾间质纤维化, 保护或改善肾功能, 提高肾小球滤过率、血红蛋白、血浆白蛋白和血清 Klotho 蛋白水平, 降低转化生长因子- $\beta$ 、结缔组织生长因子、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素-6、白细胞介素-1 和白细胞介素-12 水平<sup>[2]</sup>。参乌益肾片的现行质量标准中定量控制成分单一, 仅对大黄素进行定量研究<sup>[3]</sup>, 未对君药、臣药中所含活性成分进行定量, 同时大黄素来源广泛, 作为该制剂定量控制指标成分的专属性不强。中药制剂所含成分复杂多样, 成分间协同作用, 单一成分难以全面评价产品的内在质量, 多指标评价方法已越来越多地应用于中药及其制剂的质量控制中<sup>[4-5]</sup>。本实验根据中医药配伍理论对参乌益肾片处方进行分析, 选取方中君、臣、佐、使药中各一个药味为代表进行研究, 以它们的活性成分为分析目标, 结合化学计量学对 12 批参乌益肾片进行聚类分析和主成分分析, 建立了参乌益肾片中多指标成分的质量综合评价模式。

## 1 仪器与材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (Agilent 公司); Mettler AB135-S 型电子分析天平 (梅特勒公司); KQ5200DA 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

$\beta$ -蜕皮甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷对照品 (中国食品药品检定研究院, 质量分数分别为 98.3%、96.0%、95.2%、98.2%、94.8%, 批号分别为 111638-201907、111914-202105、111530-

201914、111910-201604、110844-202116); 25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、异毛蕊花糖苷对照品 (成都普瑞法科技开发有限公司, 质量分数分别为 97.6%、94.3%、97.0%, 批号分别为 PRF8041745、PRF8041744、PRF9010243); 参乌益肾片为薄膜衣片, 规格 0.4 g/片, 购于江苏康缘阳光药业有限公司, 批号分别为 200201、200202、200304、200402、200501、201101、210304、210501、210510、210606、211001、211202, 编号分别为 S1~S12; 乙腈和甲酸为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 Sepax Bio-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 以乙腈 (A) - 0.1% 甲酸 (B) 进行梯度洗脱 (0~11 min, 17.0% A; 11~20 min, 17.0% $\rightarrow$ 35.0% A; 20~40 min, 35.0% $\rightarrow$ 42.0% A; 40~46 min, 42.0% $\rightarrow$ 70.0% A; 46~60 min, 70.0% $\rightarrow$ 17.0% A); 检测波长分别为 250 nm (0~20 min 测定  $\beta$ -蜕皮甾酮<sup>[6-7]</sup>、25R-牛膝甾酮<sup>[8]</sup>和 25S-牛膝甾酮<sup>[8]</sup>)、330 nm (20~60 min 测定大车前苷<sup>[9-10]</sup>、毛蕊花糖苷<sup>[11-12]</sup>、异毛蕊花糖苷<sup>[11-12]</sup>、木通苯乙醇苷 B<sup>[10]</sup>和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷<sup>[13-14]</sup>); 柱温 30  $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10  $\mu$ L。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 分别取  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷对照品适量, 精密称定, 加入 60% 甲醇制得质量浓度分别为 0.294、0.132、0.148、1.160、3.154、0.916、0.258、1.756 mg/mL 的混合对照品贮备液。再精密吸取 1.0 mL, 用 60% 甲醇稀释 20 倍, 制得混合对照品溶液 (8 种成分的质量浓度分别为 14.7、6.6、7.4、58.0、157.7、45.8、12.9、87.8 mg/mL)。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取参乌益肾片, 除去包衣研细, 精密称细粉约 1.0 g, 置 25 mL 量瓶中, 加 60% 甲醇 20 mL, 超声处理 30 min, 放冷并用 60%

甲醇稀释至刻度，摇匀，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，得续滤液，即得。

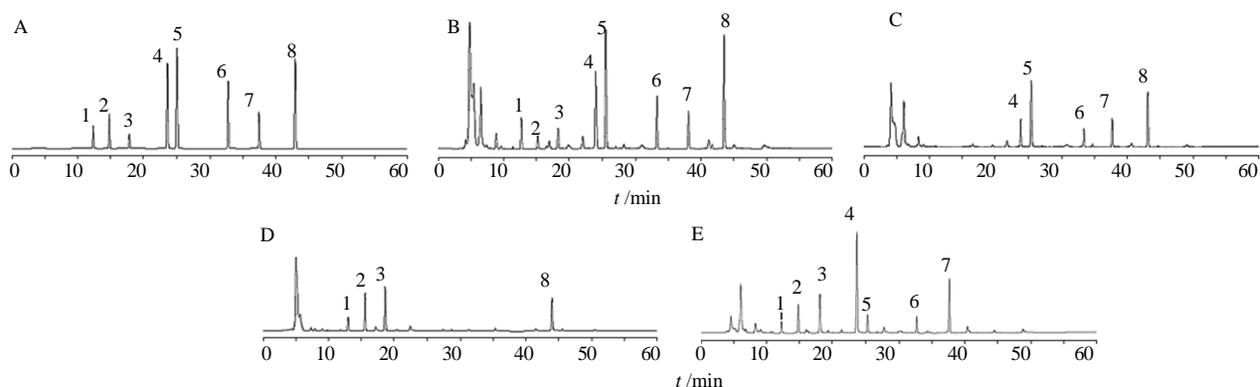
**2.2.3 阴性样品溶液的制备** 按照参乌益肾片的质量标准中处方、工艺分别制备缺怀牛膝、缺车前子、缺制何首乌的阴性样品适量，按照供试品溶液的制备方法制成相应的阴性样品溶液。

**2.3 方法学考察**

**2.3.1 系统适用性** 精密吸取对照品溶液、供试品溶液和缺车前子、怀牛膝、制何首乌的阴性样品溶液，依次注入色谱仪测定，结果见图 1。可见参乌益肾片中 β-蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷

苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷与相邻峰分离度均大于 1.5，理论板数以 8 种成分色谱峰计均大于 6000，阴性样品溶液不干扰 8 种成分的检测。

**2.3.2 线性关系考察** 精密吸取对照品贮备液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL，采用稀释法制得 6 个系列混合对照品溶液，依法进样分析，将 β-蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷的质量浓度设为横坐标，峰面积积设为纵坐标，进行线性回归，结果见表 1。



1-β-蜕皮甾酮 2-25R-牛膝甾酮 3-25S-牛膝甾酮 4-大车前苷 5-毛蕊花糖苷 6-异毛蕊花糖苷 7-木通苯乙醇苷 B 8-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷  
1-β-ecdysterone 2-25R-inokosterone 3-25S-inokosterone 4-plantamajoside 5-verbascoside 6-isoacteoside 7-calceolarioside B 8-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside

**图 1** 混合对照品 (A)、参乌益肾片 (B)、缺车前子阴性样品 (C)、缺怀牛膝阴性样品 (D) 和缺制何首乌阴性样品 (E) 的 HPLC 图谱

**Fig. 1** HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Shenwu Yishen Tablets (B), negative sample without *Plantaginis Semen* (C), negative sample without *Achyranthis Bidentatae Radix* (D), and negative sample without *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* (E)

**表 1** 各成分的回归方程和线性范围

**Table 1** Regression equation and linear range for components

对照品	回归方程	r	线性范围/(μg·mL <sup>-1</sup> )
β-蜕皮甾酮	$Y=3.171\ 6\times 10^6 X+871.4$	0.999 9	1.47~36.75
25R-牛膝甾酮	$Y=7.948\ 1\times 10^5 X-1\ 325.6$	0.999 2	0.66~16.50
25S-牛膝甾酮	$Y=1.025\ 6\times 10^6 X+672.5$	0.999 2	0.74~18.50
大车前苷	$Y=2.558\ 7\times 10^6 X-454.3$	0.999 6	5.80~145.00
毛蕊花糖苷	$Y=1.760\ 9\times 10^6 X-1266.8$	0.999 7	15.77~394.25
异毛蕊花糖苷	$Y=2.101\ 8\times 10^6 X-681.1$	0.999 9	4.58~114.50
木通苯乙醇苷 B	$Y=1.377\ 8\times 10^6 X+1\ 173.4$	0.999 7	1.29~32.25
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷	$Y=2.285\ 0\times 10^6 X-899.3$	0.999 8	8.78~219.50

**2.3.3 精密度试验** 吸取混合对照品溶液, 连续 6 次进样分析, 计算得  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷峰面积的 RSD 值分别为 1.18%、1.22%、1.03%、0.86%、0.53%、0.97%、1.04%、0.68%。

**2.3.4 稳定性试验** 取批号 200201 参乌益肾片样品, 制备供试品溶液, 于制备后 0、2、5、9、16、24 h 进样分析, 计算得  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷峰面积的 RSD 值分别为 1.26%、1.39%、1.10%、0.95%、0.60%、1.07%、1.19%、0.75%, 结果表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

**2.3.5 重复性试验** 取批号 200201 参乌益肾片样品 6 份, 平行制备供试品溶液, 进样测定, 结果  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷质量分数的 RSD 值分别为 1.71%、1.88%、1.90%、1.65%、0.94%、1.12%、1.79%、1.07%。

**2.3.6 回收率试验** 取批号 200201 参乌益肾片样品 9 份, 每份 0.5 g, 均分成 3 组, 每组分别精密加入混合对照品溶液 (含  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷 0.162、0.061、0.079、0.670、2.071、0.482、0.125、1.263 mg/mL) 0.8、1.0、1.2 mL, 制备供试品溶液, 进样检测分析, 结果  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷的平均回收率分别为 97.78%、96.90%、97.96%、99.67%、100.01%、99.54%、98.03%、100.11%, RSD 值分别为 1.17%、0.82%、1.48%、0.93%、0.77%、0.69%、1.13%、0.65%。

## 2.4 样品测定

取参乌益肾片样品 12 批, 分别制备供试品溶液, 分别依法进样分析, 采用外标法计算  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷的质量分数, 结果见表 2。

表 2 参乌益肾片中  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷测定结果 ( $n=3$ )

Table 2 Results of  $\beta$ -ecdysterone, 25R-inokosterone, 25S-inokosterone, plantamajoside, verbascoside, isoacteoside, calceolarioside B, and 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside in Shenwu Yishen Tablets ( $n=3$ )

编号	质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )							
	$\beta$ -蜕皮甾酮	25R-牛膝甾酮	25S-牛膝甾酮	大车前苷	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	木通苯乙醇苷 B	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷
S1	0.319	0.127	0.152	1.341	4.169	0.971	0.246	2.514
S2	0.368	0.151	0.174	1.334	4.259	0.757	0.235	2.383
S3	0.330	0.105	0.145	1.348	3.948	0.809	0.220	2.651
S4	0.342	0.166	0.157	1.435	4.363	0.701	0.229	2.110
S5	0.281	0.130	0.147	1.014	3.584	0.636	0.214	1.453
S6	0.200	0.119	0.139	1.306	3.319	0.509	0.202	1.309
S7	0.183	0.111	0.133	1.277	3.250	0.582	0.194	1.166
S8	0.294	0.163	0.126	1.247	5.019	1.094	0.311	3.845
S9	0.356	0.203	0.119	1.218	5.242	1.149	0.325	3.746
S10	0.249	0.172	0.112	1.175	5.344	1.201	0.305	3.577
S11	0.307	0.196	0.103	1.132	5.449	1.365	0.333	4.055
S12	0.240	0.182	0.098	1.089	5.129	1.256	0.318	4.189

根据 12 批参乌益肾片中各成分测定结果, 暂定本品含怀牛膝以  $\beta$ -蜕皮甾酮计不得少于 0.16 mg/g、以 25R-牛膝甾酮计不得少于 0.09 mg/g、以 25S-牛膝甾酮计不得少于 0.08 mg/g; 含车前子以大车前苷计不得少于 0.85 mg/g、以毛蕊花糖苷计不得少于 2.80 mg/g、以异毛蕊花糖苷计不得少于 0.45 mg/g、以木通苯乙醇苷 B 计不得少于 0.17 mg/g; 含制何首乌以 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷计不得少于 1.00 mg/g。

### 2.5 参乌益肾片的化学计量学质量分析

**2.5.1 聚类分析** 将表 2 中数据导入 SPSS 26.0 统计软件, 采用系统聚类、组间联接、欧氏距离的方法进行聚类分析, 见图 2。当间距为 10 时, 12 批参乌益肾片样品聚为 3 类, S1~S4 为一类, S5~S7 为一类, S8~S12 为一类。

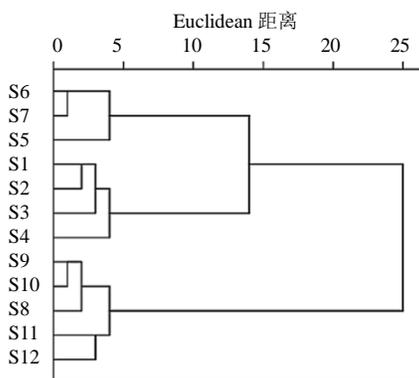


图 2 参乌益肾片样品聚类树状图

Fig. 2 Cluster tree diagram of Shenwu Yishen Tablets

**2.5.2 主成分分析** 将表 2 中结果数据导入 SPSS 26.0 统计软件, 采用降维的方法提取主成分, 得各

主成分特征值和方差贡献率, 结果见表 3、4。表 3 中主成分矩阵可以看出第一主成分的信息来自 25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷等成分的综合, 第 2 主成分的信息来自  $\beta$ -蜕皮甾酮和大车前苷的信息。由表 4 可知前 2 个主成分特征值为 5.447、1.663, 对方差的贡献率分别为 68.083%、20.792%, 累计方差贡献率为 88.874%, 表明选取前 2 个主成分即可代表参乌益肾片 88.874% 的信息量。

应用 SIMCA 14.1 统计软件建立 PCA 模型, 见图 3。共提取出 2 个主成分  $R^2X$  为 0.889, 大于 0.5, 所建立的模型稳定性较高。可以看出, S1~S4、S5~S7、S8~S12 分别呈现一定关联性。

表 3 参乌益肾片中 8 种成分的成分矩阵

Table 3 Composition matrix table of 8 components in Shenwu Yishen Tablets

成分	主成分	
	1	2
$\beta$ -蜕皮甾酮	0.213	0.913
25R-牛膝甾酮	0.888	0.175
25S-牛膝甾酮	-0.775	0.570
大车前苷	-0.482	0.642
毛蕊花糖苷	0.967	0.205
异毛蕊花糖苷	0.969	0.034
木通苯乙醇苷 B	0.992	0.040
2,3,5,4'-四羟基二苯乙 烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷	0.960	0.135

表 4 参乌益肾片中主成分方差分析

Table 4 Initial eigenvalues and contribution rate of principal components in Shenwu Yishen Tablets

主成分	初始特征值			提取荷载平方和		
	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	5.447	68.083	68.083	5.447	68.083	68.083
2	1.663	20.792	88.874	1.663	20.792	88.874
3	0.518	6.475	95.349			
4	0.252	3.147	98.496			
5	0.061	0.764	99.260			
6	0.032	0.396	99.656			
7	0.018	0.224	99.880			
9	0.010	0.120	100.000			

**2.5.3 偏最小二乘法 - 判别分析 (PLS-DA)** PLS-DA 通过对数据的分析能够找出引起产品质量差异的特征成分。将 12 批参乌益肾片样品中 8 种成分测定数据分别导入 SIMCA 14.1 统计软件, 进行 PLS-DA 程序运行, 得图 4, 结果累积解释能力参数 ( $R^2X$ 、 $R^2Y$ ) 分别为 0.957、0.869, 预测能力参数  $Q^2$  为 0.793, 均大于 0.5, 表明所建立的模型稳定可靠、预测能力强, 可用于区分不同批次的参乌益肾片样品。由图 4 可以看出 12 批参乌益肾片样品的含量数据点均落在 95% 置信区间内, 根据分布可分为 3 类, 与聚类分析和主成分分析结果一致。

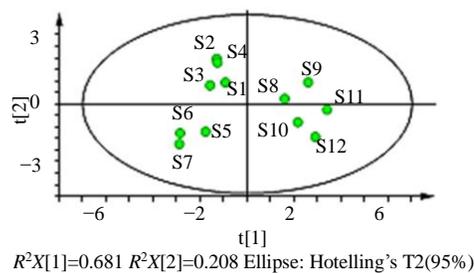


图 3 PCA 得分图

Fig. 3 Score plot of PCA

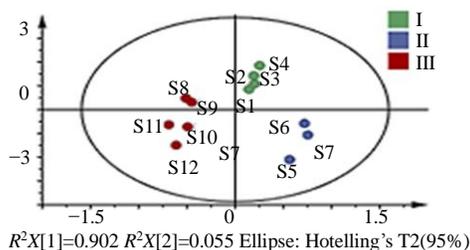


图 4 12 批参乌益肾片样品的 PLS-DA 模型得分图

Fig. 4 Score plot of PLS-DA of 12 batches of Shenwu Yishen Tablets

对建立的 PLS-DA 模型进行置换检验 200 次 (图 5), 结果显示  $R^2$  拟合直线  $Y$  轴截距为 0.125, 小于 0.3, 表明所建立的模型结果可靠;  $Q^2$  拟合直线  $Y$  轴截距为 -0.264 ( $<0.05$ ), 表明所建立的模型不存在过度拟合, 能有效判别 12 批参乌益肾片的质量差异。根据变量重要性投影 (VIP) 值筛选影响药物炮制前后参乌益肾片中化学成分差异的标志性成分 (图 6), 结果成分 8 (2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷 VIP=1.503)、成分 4 (大车前苷 VIP=1.404)、成分 5 (毛蕊花糖苷 VIP=1.274)、成分 1 ( $\beta$ -蜕皮甾酮 VIP=1.030), 即 VIP 大于 1 的这 4 个成分均对参乌益肾片样品质量的影响较大,

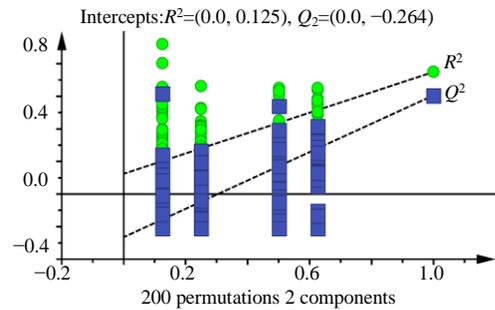


图 5 PLS-DA 置换检测图

Fig. 5 Permutation plot of PLS-DA

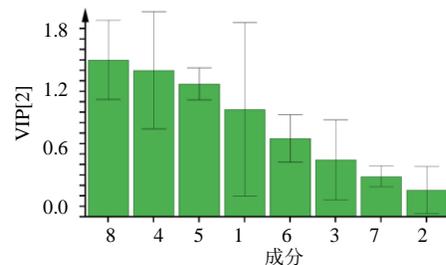


图 6 12 批参乌益肾片样品的 VIP 图

Fig. 6 VIP values of samples of 12 batches of Shenwu Yishen Tablets samples

是影响参乌益肾片产品质量的主要潜在标志物。

### 3 讨论

#### 3.1 目标成分的确定

参乌益肾片由怀牛膝、车前子、制何首乌、菟丝子、太子参、麸炒苍术、枸杞子、泽兰、赤芍、茯苓、泽泻和熟大黄组方而成, 方中制何首乌补肝肾、益精血、化浊降脂, 菟丝子补益肝肾、固精缩尿, 二者为君药; 太子参益气健脾、生津润肺, 制苍术燥湿健脾, 枸杞子滋补肝肾、益精明目, 怀牛膝补肝肾、强筋骨, 4 味合为臣药; 佐使药中茯苓解毒、除湿、通利关节, 泽泻、车前子利水渗湿、泄热通淋, 泽兰活血祛瘀、利水消肿, 制大黄泻下攻积、凉血解毒、逐瘀利湿。本实验以君药何首乌、臣药怀牛膝、佐使药车前子为研究对象, 以何首乌中二苯乙烯苷类成分 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷, 怀牛膝中甾酮类物质  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮和 25S-牛膝甾酮, 车前子中主要苯乙醇苷类成分大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和木通苯乙醇苷 B 为分析目标。

#### 3.2 色谱条件的选择

为使测定的 8 种成分得到良好的分离, 实验重点考察了流动相乙腈 - 0.1% 甲酸<sup>[9, 12]</sup>、甲醇 - 0.1%

甲酸<sup>[13]</sup>、乙腈-0.5%乙酸水溶液<sup>[11]</sup>和乙腈-水<sup>[14]</sup>, 结果发现乙腈-0.1%甲酸系统洗脱时, 目标成分能达到基线分离, 色谱峰对称, 与相邻干扰峰完全分离, 最终采用乙腈-0.1%甲酸作为流动相。在 190~400 nm 对混合对照品溶液进行扫描, 此 8 种成分紫外吸收的不同, 并且中药成分复杂, 在一个波长下难以体现所有成分的特征, 故采用分段变波长检测法对这 8 种活性成分进行检测, 结合杂质干扰和目标成分灵敏度的情况, 最终确定在 250 nm 波长处检测  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮和 25S-牛膝甾酮, 在 330 nm 波长处检测大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷。

### 3.3 供试品制备方法的选择

在参乌益肾片供试品溶液制备时, 本实验重点对提取溶剂水饱和正丁醇溶液、60% 甲醇、乙醇、甲醇、50% 乙醇, 提取方式超声<sup>[15]</sup>、加热回流<sup>[16]</sup>, 提取时间 25、30、35、40 min 进行了考察, 以 8 种成分综合提取率为指标, 同时结合杂质情况, 最终确定使用 60% 甲醇溶液超声处理 30 min。

本研究采用 HPLC 法对参乌益肾片中 8 种成分  $\beta$ -蜕皮甾酮、25R-牛膝甾酮、25S-牛膝甾酮、大车前苷、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B 和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷进行了同时检测, 所建立的方法简便快捷、准确可靠, 同时联合化学计量学对 12 批参乌益肾片样品质量进行了综合评价, 挖掘了影响参乌益肾片产品质量的主要潜在标志物, 有助于药品生产企业挖掘原药材与制剂质量间存在的内在关联关系, 不断提升原药材的内控质量标准, 逐步稳定原药材产地、种属等影响因素, 为最终达到制剂质量稳定和临床疗效的一致性、合理指导临床用药提供了实验依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

[1] 王钢, 邹燕琴, 孔薇, 等. 邹云翔教授治疗慢性肾衰竭名方参乌益肾片新药开发总结 [J]. 世界中医药, 2013, 8(9): 989-993.

[2] 王敏, 张立元, 马国平, 等. 参乌益肾片对慢性肾脏病 4~5 期肾间质纤维化和微炎症状态的影响观察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(23): 125-130.

[3] 国家药品标准 YBZ00872010 [S]. 2010.

[4] 韩洁, 刘源, 贾号, 等. 复方地锦胶囊中 8 种成分的 HPLC 法测定及其化学计量学综合评价 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(1): 58-63.

[5] 宋奇, 王隆隆, 杨忠杰, 等. 双石清热合剂指纹图研究及 5 种成分含量测定 [J]. 中南药学, 2022, 20(1): 154-158.

[6] 穆海风, 李会军, 陈君, 等. HPLC 法同时测定怀牛膝中 3 种甾酮类成分 [J]. 中国药科大学学报, 2014, 45(2): 210-212.

[7] 康浩, 孙亮亮, 姚应水. 基于 UPLC 特征图谱和 QAMS 对怀牛膝药材质量控制的应用研究 [J]. 皖南医学院学报, 2021, 40(2): 120-124.

[8] 张留记, 刘晓苗, 屠万倩, 等. HPLC 法同时测定怀牛膝中 5 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(4): 623-629.

[9] 柴瑞平, 路娟, 王晓静, 等. 波长切换 HPLC 同时测定车前草中 5 个活性成分的含量 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(9): 1092-1096.

[10] 黄桃芬, 卢丹逸, 喻芳君, 等. HPLC 法同时测定车前草中 4 种成分的含量 [J]. 中药材, 2017, 40(3): 645-648.

[11] 田伟, 甄亚钦, 董秋菊, 等. 车前子煎煮过程中 4 种化学成分含量变化规律研究 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(16): 1927-1931.

[12] 刘淑梅, 阳建军, 李梦阳. 不同产地车前草 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 食品与药品, 2021, 23(1): 29-34.

[13] 柯颖川, 陈继英, 陈锡培, 等. 何首乌炮制后化学成分定性定量分析 [J]. 中医临床研究, 2021, 13(22): 42-45.

[14] 张雪. 何首乌二苯乙烯苷类成分研究进展 [J]. 农业科技与装备, 2018, 43(6): 31-32.

[15] 王博, 孟啸龙, 徐宁, 等. 基于 HPLC 指纹图谱技术的不同厂家怀牛膝饮片质量评价 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(6): 1364-1367.

[16] 李正刚, 马彧, 王丹彧, 等. HPLC 法测定制何首乌饮片中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷含量的不确定度评估 [J]. 中国医药导报, 2021, 23(7): 522-525.

[责任编辑 解学星]