

HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价补中益气合剂的质量

金 凤^{1,2}, 庄会芳^{1,2}, 崔琳琳^{1,2}, 刘震远^{1,2}, 刘珊珊³, 顾仕苓^{1,2}, 白 雪^{1,2}, 杨 梅^{1,2*}, 张 微^{1,2*}

1. 鲁南制药集团股份有限公司 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 山东 临沂 276000

2. 鲁南厚普制药有限公司 中药制药共性技术山东省工程研究中心, 山东 临沂 276000

3. 潍坊市第六人民医院, 山东 潍坊 261021

摘要: 目的 建立补中益气合剂的高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 结合化学模式识别技术对补中益气合剂进行质量评价。方法 采用 HPLC 法建立 10 批补中益气合剂 HPLC 指纹图谱, 以层次聚类分析 (HCA) 和主成分分析 (PCA) 进行多元统计分析补中益气合剂的质量。结果 10 批补中益气合剂相似度均大于 0.90, 得到 31 个共有峰, 通过对照品指认了其中 6 个峰对应的成分; HCA 将 10 批样品分为 3 类, PCA 得到 6 个主成分, 累积方差贡献率为 96.503%。结论 HPLC 指纹图谱结合化学计量学可综合评价补中益气合剂的质量。

关键词: 补中益气合剂; HPLC; 指纹图谱; 层次聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2026)04 - 0981 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.04.013

Quality evaluation of Buzhong Yiqi Mixtures by HPLC fingerprint combined with chemometrics

JIN Feng^{1,2}, ZHUANG Huifang^{1,2}, CUI Linlin^{1,2}, LIU Zhenyuan^{1,2}, LIU Shanshan³, GU Shiling^{1,2}, BAI Xue^{1,2}, YANG Mei^{1,2}, ZHANG Wei^{1,2}

1. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000, China

2. Shandong Engineering Research Center of Generic Manufacture Technology of Traditional Chinese Medicine, Lunan Hope Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 276000, China

3. Sixth People's Hospital of Weifang, Weifang 261021, China

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint for Buzhong Yiqi Mixtures, and to evaluate its quality using chemometric pattern recognition techniques. **Methods** HPLC fingerprints of 10 batches of Buzhong Yiqi Mixtures were established by HPLC method. Hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were utilized for multivariate statistical analysis to evaluate the quality of Buzhong Yiqi Mixtures. **Results** The similarity of 10 batches of Buzhong Yiqi Mixtures was all greater than 0.90, with 31 common peaks identified. Six peaks corresponding to their components were identified through reference substances. HCA allowed the 10 batches of samples to be divided into three categories, and PCA yielded six principal components, with a cumulative variance contribution rate of 96.503%. **Conclusion** The combination of HPLC fingerprint and chemometrics can comprehensively evaluate the product quality of Buzhong Yiqi Mixtures.

Key words: Buzhong Yiqi Mixtures; HPLC; fingerprints; hierarchical cluster analysis; principal component analysis

补中益气合剂是中医经典名方“补中益气汤”的现代成方制剂, 由炙黄芪、党参、炙甘草、炒白术、当归、升麻、柴胡、陈皮、生姜、大枣 10 味中

药组成, 具有补中益气、升阳举陷的功效, 临床用于脾胃虚弱、中气下陷所致的泄泻、脱肛等症的治疗^[1-3]。补中益气合剂现有质控标准收载于《中国药

收稿日期: 2025-11-06

基金项目: 山东省重点研发计划 (竞争性创新平台) 项目 (2024CXPT074); 泰山产业领军人才工程专项 (tscx202312102)

作者简介: 金 凤 (1992—), 女, 工程师, 硕士研究生, 研究方向为中药质量分析。E-mail: 2025211168@mail.sdu.cn

*通信作者: 杨 梅, 女, 副高级工程师, 硕士, 研究方向为中药研发与技术推广研究。E-mail: yangmei22@163.com

张 微, 女, 副高级工程师, 硕士, 研究方向为中药研发与技术推广研究。E-mail: 1354524026@139.com

典》2025 年版一部, 仅将黄芪甲苷作为质量指标进行检测, 其检测成分比较单一, 而中药复方制剂由于药物间的相互作用, 化学成分更加复杂多变, 仅用一种或者几种化学成分较难全面地评价复方制剂的质量和工艺^[4-7]。因此, 本研究在对补中益气合剂中化学成分研究的前期基础上^[8-9], 采用高效液相色谱技术建立补中益气合剂的指纹图谱, 并结合化学计量学对多批次的产品质量进行综合评价, 以期对补中益气合剂质量标准的提升提供支撑^[10-11]。

1 仪器与试剂

Waters 2998 高效液相色谱仪, 包括四元泵、在线脱气、Waters 2998 PDA 检测器、Empower 工作站 (Waters 公司); XS-204 万分之一电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); 液晶超声波清洗器 (昆山洁力美超声仪器有限公司)。

毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 111920-201606, 质量分数 97.6%)、阿魏酸 (批号 110773-201915, 质量分数 99.4%)、甘草苷 (批号 111610-201908, 质量分数 95.0%)、橙皮苷 (批号 110721-201818, 质量分数 96.2%)、甘草酸铵 (批号 110731-202122, 质量分数 94.4%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 藜本内酯 (批号 RFS-G01011812030, 质量分数 99.1%) 对照品购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 苯甲酸钠对照品 (批号 20230501, 质量分数 98.0%), 购自成都华邑药用辅料制造有限公司; 甲醇、乙腈为色谱纯 (Merck 公司), 其他试剂均为分析纯, 水为自制超纯水。

补中益气合剂共 10 批, 批号分别为 210203、210208、210209、210211、210213、260708、260709、260710、260721、260227, 编号依次为 S1~S10, 规格 10 mL/支, 鲁南厚普制药股份有限公司提供; 炙黄芪 (产地甘肃)、党参 (产地甘肃)、炙甘草 (产地内蒙古)、炒白术 (产地浙江)、当归 (产地云南)、升麻 (产地辽宁)、柴胡 (产地四川)、陈皮 (产地广西)、生姜 (产地山东)、大枣 (产地新疆) 均购自鲁南厚普制药股份有限公司, 经魏瑞霞高级工程师鉴定均为正品, 凭证样品保存于经方与现代中药融合创新全国重点实验室。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Zorbax SB-Aq 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1%磷酸溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~20 min, 0%→8% B; 20~35

min, 8%→15% B; 35~50 min, 15%→20% B; 50~80 min, 20%→50% B); 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长为 268 nm, 柱温 30 °C, 进样量为 5 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、甘草苷、橙皮苷、甘草酸铵、藜本内酯对照品适量, 置同一量瓶中, 加色谱甲醇制成各成分质量浓度分别为 0.097 0、0.052 4、0.628 2、0.492 8、1.290 1、0.124 1 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取补中益气合剂, 精密量取 2 mL, 置 10 mL 量瓶, 加甲醇适量, 超声处理 30 min, 取出, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 单味药材样品溶液的制备 取炙黄芪、党参、炙甘草、炒白术、当归、升麻、柴胡、陈皮、生姜、大枣粉末 (过四号筛) 约 2 g, 精密称定, 其余操作同供试品溶液的制备项下方法操作, 即得。

2.3 精密度试验

取批号 210203 补中益气合剂, 制备供试品溶液, 连续 6 次进样检测, 以苯甲酸钠为参照峰, 分别记录共有峰保留时间和相对峰面积, 结果显示共有峰的保留时间 RSD 值均小于 0.3%, 相对峰面积 RSD 值均小于 2.4%。

2.4 重复性试验

取批号 210203 补中益气合剂各 6 份, 制备供试品溶液, 进样检测, 以苯甲酸钠为参照峰, 记录共有峰保留时间和相对峰面积, 结果显示共有色谱峰的保留时间 RSD 值均小于 0.4%, 相对峰面积 RSD 值小于 2.7%。

2.5 稳定性试验

取批号 210203 补中益气合剂, 制备供试品溶液, 分别于 0、3、6、9、12、16、24 h 进样检测, 以苯甲酸钠为参照峰, 计算共有峰保留时间和相对峰面积, 结果显示共有色谱峰保留时间 RSD 值均小于 0.6%, 相对峰面积 RSD 值均小于 2.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 相似度评价

将 10 批补中益气合剂制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图。将所有样品的色谱图经过统一积分处理后导入国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统 2012A 版本》软件进行处理。以批号 210203 的 HPLC 色谱图作为参照图谱 (用于保留时

间校正), 时间窗宽度 0.1 s, 设置中位法、目标峰匹配, 生成对照指纹图谱 (图 1 中 R)。10 批样品指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱见图 1。以相似度评价系统计算, 得到 10 批样品与对照指纹图谱的相似度结果分别为 0.998、0.996、0.998、0.997、0.998、0.999、0.999、0.999、0.997、0.998, 相似度均较高, 表明各批次间制备工艺较稳定, 质量一致性较好。

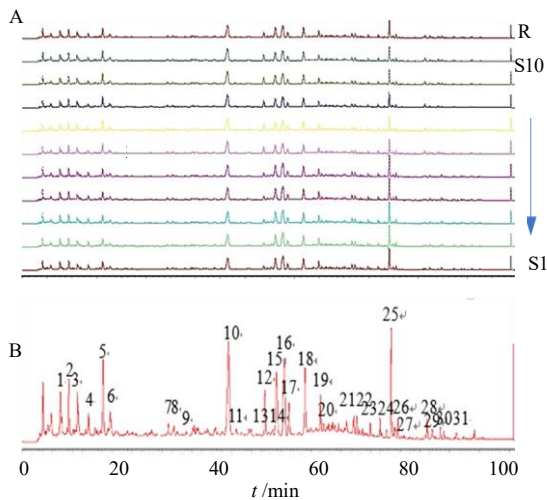


图 1 补中益气合剂的 HPLC 指纹图谱叠加图 (A) 和对照指纹图谱 (B)

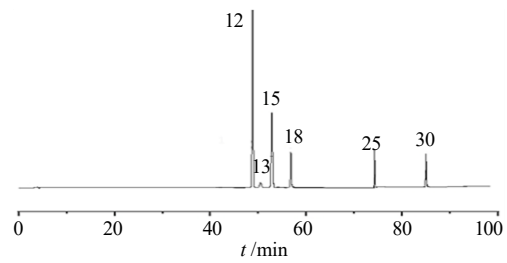
Fig. 1 HPLC fingerprint overlay graph (A) and reference fingerprint (B) of Buzhong Yiqi Mixture

2.7 共有峰的标定

对 10 批补中益气合剂图谱叠加形成的对照指纹图谱中的特征色谱峰进行编号, 共标记出 31 个共有峰。对其中 6 个共有成分进行指认, 分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (峰 12)、阿魏酸 (峰 13)、甘草苷 (峰 15)、橙皮苷 (峰 18)、甘草酸铵 (峰 25)、藜本内酯 (峰 30), 见图 2。

2.8 共有峰归属

将供试品溶液、单味药材溶液分别测定, 通过对比各峰保留时间和峰面积对色谱峰进行指认。结果见图 3, 确认了 23 个色谱峰的药材归属, 2、3、4、10、15、19 号峰归属于柴胡, 2、4、5 号峰归属于白术, 2、3、4、10、17、18 (橙皮苷)、28 号峰归属于陈皮, 1、2、3、4、13、30 (藜本内酯) 号峰归属于当归, 2、3、4、5、6 号峰归属于党参, 1、2、3、4、12 (毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、19、28 号峰归属于黄芪, 2、11、16、22、27 号峰归属于升麻, 1、2、4、8、15 (甘草苷)、16、25 (甘草酸铵)、27、31 号峰归属于甘草, 2、3、4 号峰归属于大枣。



12-毛蕊异黄酮葡萄糖苷, 13-阿魏酸, 15-甘草苷, 18-橙皮苷, 25-甘草酸铵, 30-藜本内酯。

12-formononetin glucoside, 13-ferulic acid, 15-liquiritin, 18-hesperidin, 25-ammonium glycyrrhizinate, 30-ligustilide.

图 2 混合对照品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of the mixed reference substances

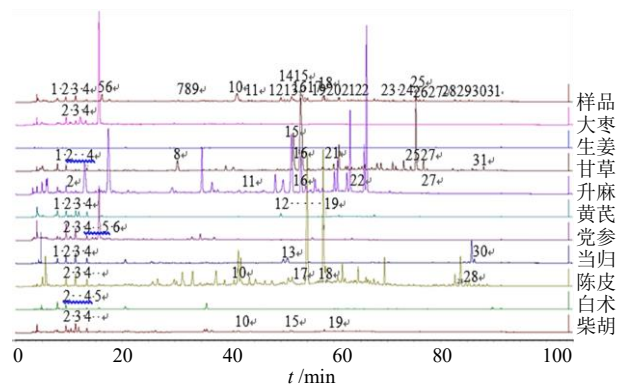


图 3 补中益气合剂样品和处方组方药味的 HPLC 图
Fig. 3 HPLC charts of Buzhong Yiqi Mixture samples and prescription formula flavors

2.9 层次聚类分析 (HCA)

HCA 是一种聚类分析方法, 通过构建层次结构的聚类树展示数据对象之间的关系, 帮助理解数据集的结构和特征。运用数据分析软件 SPSS 26.0, 选择组间连接法, 以欧氏距离为测度, 以 10 批补中益气合剂样品中 31 个共有峰的相对峰面积为变量进行 HCA, 结果见图 4。10 批补中益气合剂样品分为 3 类, S5、S10、S1、S7 聚为第 1 类, S4、S8、S3 聚为第 2 类, S6、S9、S2 聚为第 3 类。

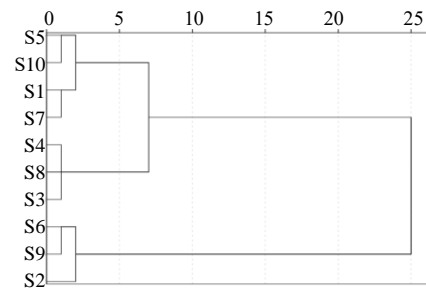


图 4 补中益气合剂的 HCA 结果

Fig. 4 HCA result of Buzhong Yiqi Mixture

2.10 主成分分析 (PCA)

将 10 批补中益气合剂样品中 31 个共有峰峰面导入 SPSS 26.0 软件, 标准化处理后进行主成分分析, 提取特征值 >1 的 5 个主成分, 累积方差贡献率为 96.503%, 可反映补中益气合剂样品的主要信息, 见表 1。

表 1 PCA 的主成分特征值与方差贡献率

Table 1 Eigenvalue and variance contribution rate of PCA

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	18.096	58.374	58.374
2	4.728	15.250	73.624
3	3.642	11.750	85.373
4	2.358	7.607	92.981
5	1.092	3.523	96.503

第 1 主成分中贡献率较高的为色谱峰 28、29、30, 第 2 主成分中贡献率较高的为色谱峰 3、18, 第 3 主成分中贡献率较高的为色谱峰 2、5、15, 第 4 主成分中贡献率较高的为色谱峰 10、20, 第 5 主成分中贡献率较高的为色谱峰 4, 见表 2。采用 Origin 软件绘制 PCA 得分图, 见图 5, 10 批补中益气合剂样品可分为 3 类, 第 1 类样品为 S5、S10、S1、S7 号, 第 2 类样品为 S4、S8、S3 号, 第 3 类样品为 S6、S9、S2 号, 与 HCA 结果一致。

3 讨论

中药成分复杂, 且多数组分尚未明确, 传统的单一成分或指标成分的质控方法难以全面评价中药的质量。中药指纹图谱技术是中药现代化的关键技术之一, 通过建立中药指纹图谱, 可以推动中药质量控制体系的建立和完善^[12-13]。

为建立稳定可靠的分析方法, 本研究分别对补中益气合剂供试品溶液的提取方式 (加热回流提取和超声提取)、提取溶剂 (水、不同体积分数的乙醇溶液和不同体积分数的甲醇溶液) 和提取时间 (20、30、40、50 min) 进行考察, 根据色谱峰的峰形、峰面积、分离度等, 最终确定供试品提取条件为以甲醇为提取溶剂, 超声提取 30 min。基于上述条件建立了补中益气合剂的 HPLC 指纹图谱, 确定其共有峰 31 个, 指认特征峰 6 个, 并且明确了其中 23 个峰的药材归属, 而这些定性和归属的峰均可作为关键质控点。与对照图谱比较, 补中益气合剂样品的相似度均大于 0.90, 表明各批次样品的一致性良好。联合化学计量学方法如 HCA、PCA 等共同分

表 2 补中益气合剂 PCA 因子载荷矩阵

Table 2 PCA factor loading matrix of Buzhong Yiqi mixture

峰号	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5
1	0.293	-0.078	-0.116	-0.454	-0.740
2	0.336	-0.463	0.738	0.351	0.005
3	0.300	0.905	0.186	0.202	0.006
4	0.246	-0.082	-0.118	-0.479	0.738
5	0.325	-0.464	0.741	0.353	0.005
6	0.996	-0.013	-0.070	-0.032	0.001
7	0.300	0.905	0.186	0.202	0.006
8	0.996	-0.013	-0.070	-0.031	0.002
9	-0.169	0.761	0.208	0.236	-0.007
10	0.237	-0.203	-0.693	0.642	0.005
11	0.981	0.001	-0.057	-0.010	-0.004
12	0.982	0.001	-0.058	-0.011	-0.004
13	0.409	0.869	0.171	0.193	0.005
14	0.986	-0.002	-0.060	-0.014	-0.003
15	0.377	-0.458	0.724	0.344	0.005
16	0.967	-0.034	-0.087	-0.064	0.008
17	0.964	-0.035	-0.087	-0.065	0.008
18	0.300	0.905	0.186	0.202	0.006
19	0.379	0.195	0.636	-0.636	-0.007
20	0.235	-0.203	-0.694	0.642	0.005
21	0.991	-0.005	-0.063	-0.020	-0.002
22	0.992	-0.006	-0.064	-0.021	-0.002
23	0.991	-0.005	-0.063	-0.019	-0.002
24	0.624	-0.394	0.604	0.292	0.003
25	0.966	-0.034	-0.087	-0.064	0.008
26	0.969	-0.033	-0.086	-0.062	0.007
27	0.976	-0.031	-0.084	-0.058	0.007
28	0.996	-0.018	-0.074	-0.039	0.002
29	0.996	-0.015	-0.072	-0.035	0.001
30	0.996	-0.012	-0.069	-0.029	0.001
31	0.989	-0.003	-0.061	-0.016	-0.003

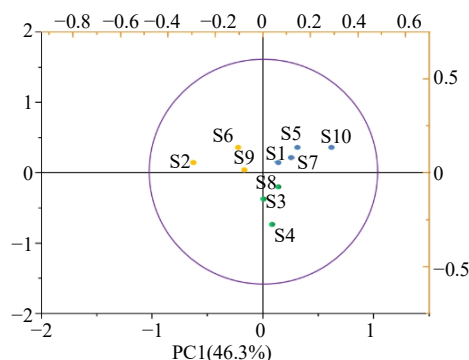


图 5 补中益气合剂 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score chart of Buzhong Yiqi mixtures

析, 10批补中益气合剂大致可分为3类, 推测其原因可能是不同批次样品间药材不同或生产时间不同造成的。

本研究选择苯甲酸钠作为参照峰, 其一, 苯甲酸钠虽不是该制剂中的活性成分, 但却是制剂中固有的药用辅料, 其色谱行为稳定, 在本实验色谱条件下保留时间适中; 其二, 与补中益气合剂中各成分的分度良好, 无干扰峰; 其三, 前期预实验验证, 以苯甲酸钠为参照峰计算的共有峰相对保留时间和相对峰面积重复性良好, 符合中药指纹图谱参照峰选择的相关规范。为了明确补中益气合剂指纹图谱共有峰的药材归属, 在样品处理中采用超声的方式最大程度地保留各单味药材中特征化学成分, 避免复杂提取工艺可能造成的成分降解或转化。现有文献报道的色谱条件与本实验存在显著差异, 直接应用文献报道方法无法保证色谱峰有效分离, 故研究结合本实验色谱条件经预实验优化确定。

本研究采用高效液相色谱建立了补中益气合剂的指纹图谱, 并通过化学计量学对多批产品质量进行整体评价分析, 不仅进一步明确了补中益气合剂组方药材中化学成分的归属, 更对补中益气合剂质量控制标准进行了极大的优化和提升。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1065.
- [2] 罗祖金. 中药补中益气辅助重症慢性阻塞性肺疾病患者撤离有创正压通气的前瞻性随机对照研究 [A] // 中国医药教育协会感染疾病专业委员会第二届学术大会、第八届全国侵袭性真菌病实验室诊断及临床治疗

新进展研讨会暨2016中国药学会药物临床评价研究专业委员会年会论文集[C]. 上海: 中国药学会, 中国医药教育协会, 2016: 6.

- [3] 谢广涛. 补中益气合剂配合多潘立酮片治疗脾虚气陷型胃下垂的疗效及对胃动力指标的影响 [J]. 新疆中医药, 2025, 43(3): 20-22.
- [4] 贺嫣然, 王婧, 许家强, 等. 补中益气方不同剂型中活性成分含量及其生物活性比较 [J]. 中成药, 2025, 47(2): 357-364.
- [5] 吕响, 程文倩, 牛可敬, 等. 基于多维整合策略的中药复方制剂质量评价研究 [J]. 中草药, 2024, 55(22): 7847-7856.
- [6] 曾瑾, 陈平, 刘阳, 等. 中药复方制剂质量控制与评价的监管科学 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40(2): 17-22.
- [7] 赵晨曦. 中药复方制剂指纹图谱质量评价研究进展 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(A2): 194.
- [8] 康佳, 陈佳昊, 贺嫣然, 等. 基于 HPLC 指纹图谱特征的不同剂型补中益气方比较研究 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(7): 1639-1644.
- [9] 金唯唯, 金华燕, 费状丽, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别辨析补中益气产品质量标志物 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2114-2126.
- [10] 张鑫, 马瑞娟, 钟华美, 等. HPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价生脉颗粒质量 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(3): 618-623.
- [11] 李莎莎, 赵宗平, 蔡萌萌, 等. HPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价和胃降逆胶囊 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(11): 2770-2774.
- [12] 房德敏. 中药指纹图谱技术的研究与应用 [J]. 中草药, 2005, 36(4): 632-634.
- [13] 马丽娜, 张岩, 陶遵威. 色谱分析技术在中药指纹图谱研究中的应用 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 58-62.

【责任编辑 解学星】