

## 基于HPLC指纹图谱结合化学模式识别的黄蛭益肾胶囊质量控制

薛起梅<sup>1</sup>, 施海蔚<sup>2</sup>, 钱叶飞<sup>3</sup>, 谭力<sup>2</sup>, 郭青<sup>2\*</sup>, 闵春艳<sup>3\*</sup>

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046

2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 江苏 南京 210019

3. 苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215104

**摘要:** 目的 建立黄蛭益肾胶囊HPLC指纹图谱, 采用指纹图谱并结合化学模式识别技术对黄蛭益肾胶囊进行质量控制。方法 采用Waters XBridge® Shield RP18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.05% 磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量1.0 mL/min, 柱温30 °C, 检测波长210 nm。采用HPLC串联四极杆飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF-MS/MS)对共有峰定性分析, 采用聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)及偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)统计分析。结果 16批样品中共标定24个共有峰, 相似度评价均大于0.9, 鉴定了其中24个峰并归属于7味药; HCA及PCA识别方法将样品分为3类; PLS-DA筛选出包括黄芪异黄酮苷、人参皂苷R<sub>g1</sub>、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、7, 2'-二羟基-3', 4'-二甲氧基异黄酮、松脂醇二葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、绿原酸在内的8种主要差异成分。结论 建立的HPLC指纹图谱可最大程度反映黄蛭益肾胶囊的药味组成信息, 较全面反映其质量, 应用的评价分析技术可合理评价其质量差异并准确寻找出差异成分, 为其质量合理控制和标准完善提供依据。

**关键词:** 黄蛭益肾胶囊; 指纹图谱; 高效液相色谱法; 液相色谱串联质谱法; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘法-判别分析; 质量控制

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 05-0956-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.05.007

## Quality control of Huangzhi Yishen Capsules based on HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition

XUE Qimei<sup>1</sup>, SHI Haiwei<sup>2</sup>, QIAN Yefei<sup>3</sup>, TAN Li<sup>2</sup>, GUO Qing<sup>2</sup>, MIN Chunyan<sup>3</sup>

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019, China

3. Suzhou Drug Inspection Detection Center, Suzhou 215104, China

**Abstract: Objective** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of Huangzhi Yishen Capsule, control the quality of Huangzhi Yishen Capsule by fingerprint and chemical pattern recognition technology. **Methods** Waters XBridge® Shield RP18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used, mobile phase was consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution, gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 °C and the detection wavelength was 210 nm. The common peaks in fingerprint were identified by HPLC-Q-TOF-MS/MS, analyzed by cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). **Results** The fingerprint of Huangzhi Yishen Capsule was established with 24 common peaks, the similarities of 16 batches of samples were all above 0.9, 24 of them were identified, which come from seven herbs; the samples could be divided into three categories by HCA, PCA and PLS-DA technic, eight components were screened out to cause quality differences, including 2'-hydroxy-3', 4'-dimethoxy-isoflavan-glucoside, Ginsenoside R<sub>g1</sub>, calycosin-glucopyranoside, 7, 2'-dihydroxy-3', 4'-dimethoxy-isoflavan, pinoselin diglucoside, calycosin, formononetin and chlorogenic acid. **Conclusion** The established HPLC fingerprint can extremely demonstrate the formulations of Huangzhiyishen Capsule and reflect its quality comprehensively. The application of evaluation software and recognition technics can

收稿日期: 2021-03-14

基金项目: 国家药典委员会药品标准制修订研究课题(2019Z040)

第一作者: 薛起梅(1995—), 在读硕士研究生, 研究方向为中药检验与分析研究。E-mail: 715642505@qq.com

\*通信作者: 郭青, 主任药师。研究方向为中药质量标准研究和安全性评价。E-mail: 494615112@qq.com

闵春艳, 主任中药师。研究方向为药品质量标准研究和安全性评价。E-mail: 944757490@qq.com

reasonably evaluate the quality difference and accurately find out the components that caused the quality difference, therefore provide the basis for reasonable quality control and standard improvement on Huangzhi Yishen Capsule.

**Key words:** Huangzhi Yishen Capsule; fingerprint; high performance liquid chromatography; liquid chromatography coupled with mass spectrometry; cluster analysis; principal component analysis; partial least squares discriminant analysis; drug quality

黄蛭益肾胶囊由黄芪、水蛭、枸杞子、牛膝、车前子、山药、薏苡仁、玄参、墨旱莲、杜仲、三七、益母草、北沙参、蝉蜕、紫河车15味药材组成,根据著名肾病学家邹云翔教授独创的经验方精制而成,功效补气养阴、健脾益肾、化痰利水,用于轻、中度慢性原发性普通型肾炎的气阴两虚或兼有血瘀,水湿证者<sup>[1]</sup>。黄蛭益肾胶囊药味众多,性质各异,化学成分复杂,该制剂目前的研究主要在临床应用方面,缺乏对其质量控制方面的研究<sup>[2-4]</sup>。现行质量标准内容简单,质量控制不全面,方法也较为落后,定量指标单一,不能表征黄蛭益肾胶囊的整体化学组成,难以对药品进行全面的的质量控制,这样势必影响临床用药的有效性。

中药指纹图谱的特点包括整体性、特征性及可量化等方面,突出中药的完整面貌,在研究中药有效成分、控制中药质量以及鉴别方面的作用越来越突出<sup>[5-6]</sup>。化学模式识别技术可将指纹图谱信息数量化,客观反映中药质量信息,包括聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)、判别分析(DA)和人工神经网络技术(ANN)等<sup>[7-8]</sup>,是一种有效评价中药质量的方法。中药指纹图谱结合化学模式识别,是中药真伪鉴别、质量评价的有力手段,已经广泛应用于中药材及制剂的质量控制方面<sup>[9-11]</sup>。本研究首次采用HPLC建立黄蛭益肾胶囊的指纹图谱,应用HPLC-Q-TOF-MS/MS对其共有成分进行定性分析,并结合HCA、PCA、和PLS-DA对其进行质量评价并发现造成不同批次间质量差异的因素,为黄蛭益肾胶囊质量控制和完善质量标准奠定基础。

## 1 材料

高效液相色谱仪 UltiMate3000(美国赛默飞世尔科技有限公司);Agilent 1290 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);Bruker 四级杆飞行时间质谱仪(德国布鲁克公司);XSE105型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);Thermo Heraeus MultifugeX3 离心机(美国赛默飞世尔科技有限公司);KUDOS 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);Milli-Q®型超纯水仪(美国密理博公司)。

对照品:松脂醇二葡萄糖苷(批号 111537-20160501,质量分数 $\geq 91.7\%$ ),购自中国食品药品

检定研究院;7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷(批号 Y28M10H84303,质量分数 $\geq 98\%$ )、黄芪异黄烷苷(批号 Y08S8H43409,质量分数 $\geq 98\%$ )、美迪紫檀苷(批号 P21N9F75533,质量分数 $\geq 98\%$ )、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 Y27F9H54731,质量分数 $\geq 98\%$ )、芒柄花苷(批号 R28O8F46957,质量分数 $\geq 98\%$ )、毛蕊异黄酮(批号 Y24N9Y75652,质量分数 $\geq 98\%$ ),均购自上海源叶生物科技有限公司;芒柄花黄素(批号 MUST-18033005,质量分数 $\geq 99.03\%$ ),购自成都曼斯特生物科技有限公司。甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯;磷酸为分析纯;水为超纯水。

黄蛭益肾胶囊16批样品、处方中每味药的原药材(经苏州市药品检验检测研究中心闵春艳主任中药师鉴定合格)、缺单味药的黄蛭益肾胶囊阴性样品均由苏州雷允上药业有限公司提供。16批样品编号 S1~S16,相应批号分别为 OC26002、PC26002、QC26001、RC26003、RC26004、RC26005、RC26006、RC26007、RC26008、RC26009、RC26010、RC26011、SC26001、SC26005、SC26006、SC26007。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

以 Waters XBridge® Shield RP18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m)为色谱柱;流动相为乙腈(A)-0.05%磷酸水(B);梯度洗脱程序:0~5 min、5%A, 5~85 min、5%~45%A;体积流量 1.0 mL/min;柱温 30  $^{\circ}$ C;进样体积 10  $\mu$ L;检测波长 210 nm。

### 2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子扫描模式,扫描范围  $m/z$  50~1 500,干燥气温度 180  $^{\circ}$ C,干燥器体积流量 6 L/min,雾化器压力 150 kPa,毛细管电压 4.5 kV,裂解电压 500 V,碰撞能量 35.0 eV。

### 2.3 溶液的制备

**2.3.1 供试品溶液的制备** 精密称定本品粉末约 2 g,置具塞锥形瓶中,加甲醇 20 mL,超声处理(功率 100 W,频率 52 kHz)30 min,取出,放冷,上清液过 0.45  $\mu$ m 的滤膜,取续滤液,即得。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 取松脂醇二葡萄糖苷、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷、黄芪异黄烷苷、美迪紫檀苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊

异黄酮、芒柄花黄素适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为18.00、8.40、21.20、8.40、20.08、15.94、29.28、16.92 mg/L的混合对照品溶液。

**2.3.3 药材溶液的制备** 取黄芪、水蛭、枸杞子、牛膝、车前子、山药、薏苡仁、玄参、墨旱莲、杜仲、三七、益母草、北沙参、蝉蜕、紫河车各2 g,同“2.3.1”项下方法制备成单味药供试品溶液。

**2.3.4 缺单味药的阴性样品溶液的制备** 分别取缺单味药的阴性样品2 g,同“2.3.1”项下方法制备成阴性样品溶液。

**2.4 方法学考察**

**2.4.1 精密密度试验** 按“2.3.1”项下方法制得供试品溶液(S1),按“2.1”项下色谱条件,连续进样6次测定。以16号峰毛蕊异黄酮为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积RSD<0.38%、3.97%,表明仪器精密密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 按“2.3.1”项下方法制得供试品溶液(S1)6份,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以16号峰毛蕊异黄酮为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积RSD<0.24%、4.35%,表明方法重复性良好。

**2.4.3 稳定性试验** 按“2.3.1”项下方法制得供试品溶液(S1),按“2.1”项下色谱条件,分别在0、3、6、12、18、24 h进样测定。以毛蕊异黄酮为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积RSD<0.24%、4.57%,表明样品在24 h内稳定。

**2.4.4 耐用性试验** 取同一批样品溶液(S1),分别

选取同一色谱柱 Waters XBridge® Shield RP18(250 mm×4.6 mm, 5 μm)的不同批号进样,批号分别为 0135383132、0136392001、0137392827,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以毛蕊异黄酮为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积RSD<0.39%、6.94%。

**2.5 指纹图谱建立及相似度评价**

将16批黄蛭益肾胶囊按照“2.3.1”项方法制备供试品溶液,根据“2.1”项色谱条件进样,得到16批样品色谱图。将色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”软件,以S1为参照图谱,时间宽度0.1 min,进行mark峰匹配,以中位数法生成黄蛭益肾胶囊的对照指纹图谱,共匹配了24个共有峰。其中16号峰毛蕊异黄酮保留时间适中,峰形较好,故选择为参照峰(S)。16批样品的相似度在0.925~0.995。结果见表1和图1。

表1 16批黄蛭益肾胶囊样品指纹图谱相似度

Table 1 Similarity evaluation results of 16 batches of Huangzhi Yishen Capsules

编号	批号	相似度	编号	批号	相似度
S1	OC26002	0.925	S9	RC26008	0.994
S2	PC26002	0.988	S10	RC26009	0.991
S3	QC26001	0.979	S11	RC26010	0.992
S4	RC26003	0.994	S12	RC26011	0.987
S5	RC26004	0.995	S13	SC26001	0.991
S6	RC26005	0.995	S14	SC26005	0.961
S7	RC26006	0.991	S15	SC26006	0.977
S8	RC26007	0.992	S16	SC26007	0.978

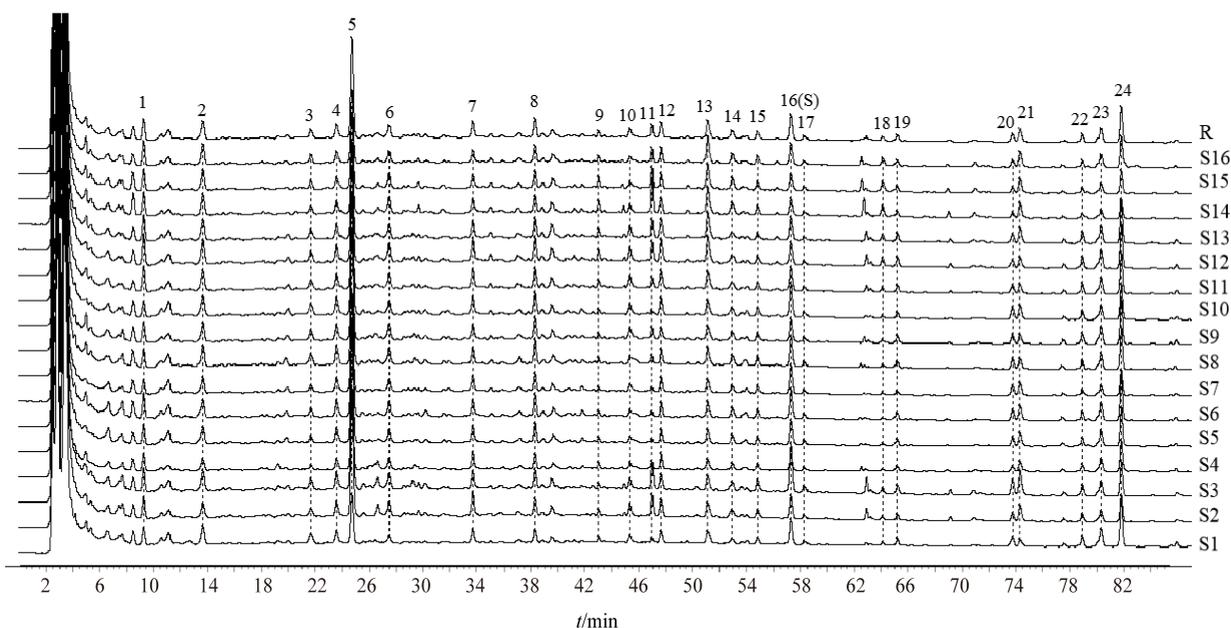


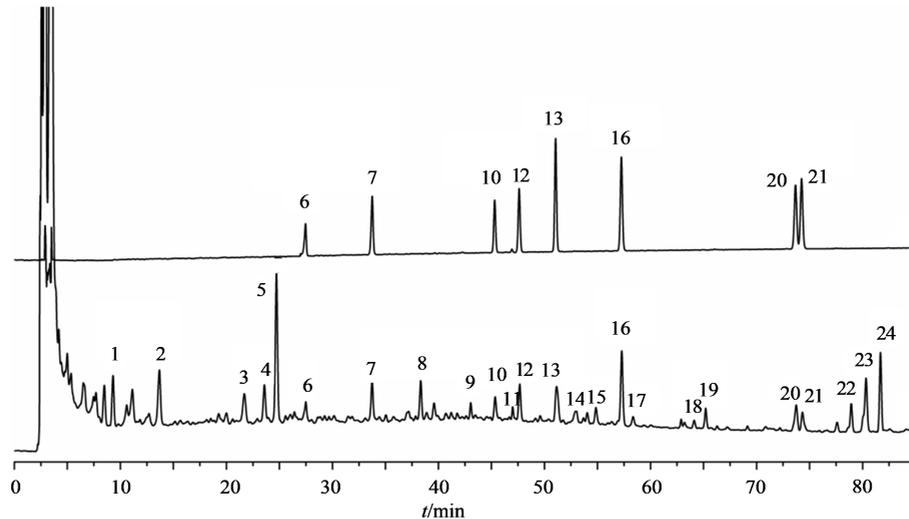
图1 16批黄蛭益肾胶囊HPLC指纹图谱及对照指纹图谱(R)

Fig. 1 HPLC fingerprints for 16 batches of Huangzhi Yishen Capsule and its control fingerprint (R)

## 2.6 指纹图谱中共有峰的化合物结构鉴定及药味归属

取黄蛭益肾胶囊供试品溶液、混合对照品溶液、对照药材溶液、各味药的阴性样品溶液,按“2.1”项下色谱条件、“2.2”项下质谱条件,分别在正、负离子模式下,进行扫描检测,得到一级准分子离子峰和二级裂解碎片,通过各对照品的二级质谱裂解规律和相关文献报道<sup>[12-20]</sup>,对黄蛭益肾胶囊的24个共有峰进行化合物结构鉴定,并进一步用对照品比对确定了其中8个峰。通过与每味药的阳性药材以及缺每味药的阴性样品对比,24个峰被分别归属到7味药材中:黄芪、杜仲、车前子、墨旱莲、益母草、三七及玄参。其中7号峰毛蕊异黄酮葡萄糖苷、12号峰美迪紫檀苷、13号峰黄芪异黄酮苷、16号峰毛蕊

异黄酮、17号峰6'-O-乙酰基芒柄花苷、20号峰芒柄花黄素、21号峰7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮共7个黄酮类成分归属于君药黄芪;1号峰京尼平苷酸、2号峰原儿茶酸、4号峰绿原酸、6号峰松脂醇二葡萄糖苷、8号峰松脂醇单葡萄糖苷、15号峰杜仲醇6种成分来源于杜仲;11号峰人参皂苷Rg<sub>1</sub>、19号峰人参皂苷Rh<sub>1</sub>、22号峰三七皂苷T<sub>5</sub>、23号峰人参皂苷Rh<sub>4</sub>、24号峰人参皂苷Rh<sub>4</sub>异构体5种皂苷类成分来源于三七;4号峰绿原酸和5号峰丁香酸来源于益母草;1号峰京尼平苷酸和3号峰车前素来源于车前子;2号峰原儿茶酸、4号峰绿原酸、18号峰木犀草素来源于墨旱莲;9号峰安格洛苷C和14号峰肉桂酸推断来源于玄参。黄蛭益肾胶囊中的24个化合物鉴定结果见图2和表2。



6-松脂醇二葡萄糖苷;7-毛蕊异黄酮葡萄糖苷;10-芒柄花苷;12-美迪紫檀苷;13-黄芪异黄酮苷;16-毛蕊异黄酮;20-芒柄花黄素;21-7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮  
6-pinosresinol diglucoside; 7-trichoisoflavone glucoside; 10-formononide; 12-medipterin; 13-astragaloside; 16-pistil isoflavone; 20-formonoflavin; 21-7,2'- dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavone

图2 混合对照品(A)及样品(B)高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of mixed reference substances (A) and sample (B)

表2 正、负离子模式下黄蛭益肾胶囊HPLC指纹图谱共有峰鉴定

Table 2 Identification of common peaks in HPLC fingerprint of Huangzhi Yishen Capsules decoction pieces under positive and negative ion modes

峰号	t/min	离子类型	测定值	理论值	误差/ $\times 10^6$	二级碎片离子	分子式	化合物	来源
1	9.3	[M-H] <sup>-</sup>	373.113	373.112	9	211.060 9, 123.005 1, 167.081 6	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	京尼平苷酸	杜仲 <sup>[13]</sup> 、车前子 <sup>[12]</sup>
2	13.8	[M-H] <sup>-</sup>	153.018	153.018	2	109.028 8	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	原儿茶酸	杜仲 <sup>[13]</sup> 、墨旱莲 <sup>[14]</sup>
3	21.8	[M-H] <sup>-</sup>	224.1401	224.1393	3.57	224.1400, 141.1024	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	车前素	车前子 <sup>[12]</sup>
4	23.7	[M-H] <sup>-</sup>	353.087	353.086	7	191.063 5	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	绿原酸	益母草 <sup>[15]</sup> 、墨旱莲 <sup>[14]</sup> 、杜仲 <sup>[13]</sup>
5	24.7	[M-H] <sup>-</sup>	197.045	197.044	4	123.0015, 166.984 6	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	丁香酸	益母草 <sup>[15]</sup>
6	27.4	[M-H] <sup>-</sup>	681.236	681.238	9	151.042 8, 357.154 0, 519.1875	C <sub>32</sub> H <sub>42</sub> O <sub>16</sub>	松脂醇二葡萄糖苷*	杜仲 <sup>[13]</sup>
7	33.8	[M+] HCOO] <sup>-</sup>	491.121	491.118	4	283.068 6, 268.044 3	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	毛蕊异黄酮葡萄糖苷*	黄芪

续表2

峰号	t/min	离子类型	测定值	理论值	误差/ $\times 10^6$	二级碎片离子	分子式	化合物	来源
		[M+H] <sup>+</sup>	447.129	0447.128	5	1.12	285.072 2、253.049 0、270.054 1		
8	38.2	[M-H] <sup>-</sup>	519.186	8519.185	7	2.12	357.143 3、151.039 2	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub> 松脂醇单葡萄糖苷	杜仲 <sup>[13]</sup>
9	42.8	[M-H] <sup>-</sup>	783.270	7783.270	6	0.12	175.046 7、607.247 4	C <sub>36</sub> H <sub>48</sub> O <sub>19</sub> 安格洛昔 C	玄参 <sup>[17]</sup>
10	45.2	[M+H] <sup>+</sup>	475.123	9475.123	5	0.87	267.073 8、252.075 4	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub> 芒柄花苷*	黄芪
		HCOO] <sup>-</sup>							
		[M+H] <sup>+</sup>	431.134	1431.133	6	1.16	269.081 2、254.058 6、213.092 6		
11	46.7	[M+H] <sup>+</sup>	845.488	3845.489	3	-1.18	799.503 9、637.445 5、475.392	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub> 人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	三七 <sup>[19]</sup>
		HCOO] <sup>-</sup>					9、161.049 8		
12	47.5	[M+H] <sup>+</sup>	507.148	1507.149	7	-3.15	299.103 7、284.077 5、269.067 9	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub> 美迪紫檀苷*	黄芪
		HCOO] <sup>-</sup>							
		[M+H] <sup>+</sup>	463.160	4463.159	8	1.3	301.108 2、167.071 0、269.081 7		
13	51.2	[M-H] <sup>-</sup>	463.161	3463.159	8	3.24	301.089 2、286.066 2、135.036 8	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>10</sub> 黄芪异黄烷苷*	黄芪
		[M+H] <sup>+</sup>	465.176	6465.175	5	2.36	303.123 5、167.071 3、123.046 1		
14	52.3	[M-H] <sup>-</sup>	147.044	3147.044	7	-2.72	116.927 1	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub> 肉桂酸	玄参 <sup>[17]</sup>
15	55.0	[M-H] <sup>-</sup>	187.096	8187.096	5	1.6	125.088 5、97.061 2	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> 杜仲醇	杜仲 <sup>[13]</sup>
16	57.2	[M-H] <sup>-</sup>	283.061	5283.061	0	1.77	268.044 6、211.045 6、239.041 8	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> 毛蕊异黄酮*	黄芪
		[M+H] <sup>+</sup>	285.075	8285.075	8	0.18	213.055 1、269.045 7、253.048 9		
17	58.2	[M+H] <sup>+</sup>	473.144	1473.144	8	-2.80	269.082 0、254.056 9、213.091 2	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub> 6"-O-乙酰基芒柄花苷	黄芪 <sup>[16]</sup>
18	64.1	[M-H] <sup>-</sup>	285.040	6285.039	3	4.56	133.036 3、151.013 3、175.045 7	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> 木犀草素	墨旱莲 <sup>[14]</sup>
		[M+H] <sup>+</sup>	287.055	6287.055	0	2.09	153.019 5、241.050 5、135.049 5		
19	64.9	[M+H] <sup>+</sup>	683.438	7683.436	4	3.37	637.463 7、475.395 6、161.052 6	C <sub>36</sub> H <sub>62</sub> O <sub>9</sub> 人参皂苷 Rh <sub>1</sub>	三七 <sup>[18]</sup>
		HCOO] <sup>-</sup>							
20	73.7	[M-H] <sup>-</sup>	267.065	6267.065	1	1.87	252.049 5、223.046 0、195.051 1	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> 芒柄花黄素*	黄芪
		[M+H] <sup>+</sup>	269.081	4269.080	8	2.23	197.069 3、225.055 5、253.051 3		
21	74.2	[M+H] <sup>+</sup>	303.123	3303.124	1	-2.64	167.070 1、152.024 1、133.256 3	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> 7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷*	黄芪
22	78.5	[M+H] <sup>+</sup>	797.470	6797.472	7	2.63	751.409 9、619.377 7、161.050 5	C <sub>41</sub> H <sub>68</sub> O <sub>12</sub> 三七皂苷 T <sub>5</sub>	三七 <sup>[19]</sup>
		HCOO] <sup>-</sup>							
23	79.9	[M+H] <sup>+</sup>	665.401	0665.426	3	-3.80	619.380 8、161.030 5、113.017 5	C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>8</sub> 人参皂苷 Rh <sub>4</sub>	三七 <sup>[20]</sup>
		HCOO] <sup>-</sup>							
24	81.4	[M+H] <sup>+</sup>	665.381	0665.426	3	-6.81	619.381 5、161.034 7、113.017 0	C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>8</sub> 人参皂苷 Rh <sub>4</sub> 异构体	三七 <sup>[20]</sup>
		HCOO] <sup>-</sup>							

\*经对照品进行确认

\* confirmed by reference substance

## 2.7 化学模式分析

**2.7.1 聚类分析(HCA)** 采用 SPSS 22.0 分析软件,运用组间连接法,Euclidean 距离平方为测度,以黄蛭益肾胶囊指纹图谱中的 24 个共有峰峰面积为变量进行聚类分析,16 批样品结果见图 3。当类间距为 15 时,16 批样品分成 3 大类:S1~S3 为第 1 类, S4~S12 为第 2 类、S13~S16 为第 3 类。从样品批次生产时间来看,第 1 类药品为 2017 年之前的,第 2 类药品为 2018 年生产,第 3 类则是 2019 年生产,说

明不同年份所生产的药品质量之间存在差异,推断可能不同年份生产所用药材的质量有所不同,或与成品的贮存时间有关。

**2.7.2 主成分分析(PCA)** 采用 SIMCA 13.0 软件,以共有峰峰面积为变量进行 PCA,得到 3 个主成分,第 1、2、3 主成分方差贡献率分别为 51.2%、23.4%、9.4%,累积贡献率达 84%,可体现出黄蛭益肾胶囊的主要信息和特征,PCA 得分图见图 4。16 批黄蛭益肾胶囊可分为 3 组,此分类结果与 SPSS 聚类分析

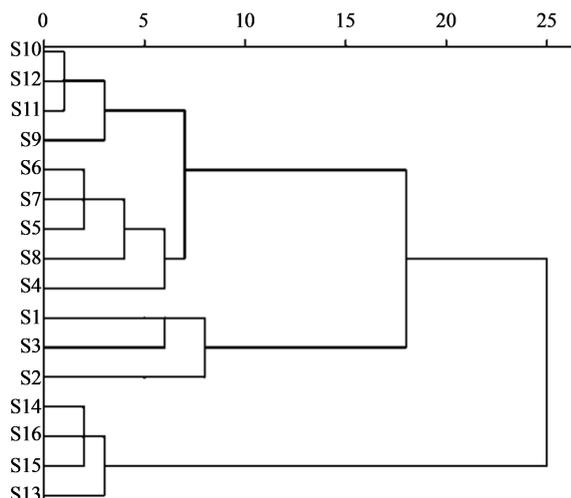


图3 16批黄蛭益肾胶囊的聚类分析图  
Fig. 3 Hierarchical cluster analysis of 16 batches of Huangzhi Yishen Capsules

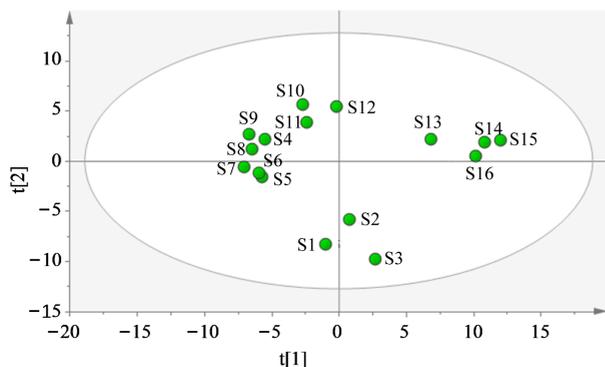


图4 16批黄蛭益肾胶囊的PCA得分图  
Fig. 4 PCA score scatter plot of 16 batches of Huangzhi Yishen Capsules

结果一致。

**2.7.3 偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)** 为了进一步分析造成不同批次样品之间差异的化学成分,在PCA的基础上进行PLS-DA处理。模型区分参数 $R^2Y=0.966$ ,模型预测参数 $Q^2=0.91$ ,表明建立的模型有效稳定<sup>[10]</sup>。同样可将16批样品分为3类,进一步验证了HCA和PCA的结果;以PLS-DA模型中重要性投影(VIP)值 $>1.0$ 筛选不同批次样品间的差异性成分,VIP值的大小表明了对样品分类的贡献度的程度。据图5可知,共找到8个成分,分别为:13号峰(黄芪异黄酮苷)、11号峰(人参皂苷 $Rg_1$ )、7号峰(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、21号峰(7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮)、6号峰(松脂醇二葡萄糖苷)、16号峰(毛蕊异黄酮)、20号峰(芒柄花黄素)、4号峰(绿原酸),表明这8种成分对黄蛭益肾胶囊质量差异影响较大。8种成分分别来自于黄芪、三七、益母草、墨旱莲、杜仲,其中5个成分归属于君药黄芪

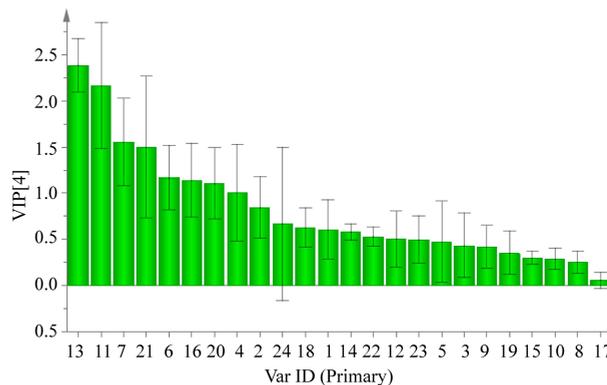


图5 16批黄蛭益肾胶囊PLS-DA模型的VIP值  
Fig. 5 VIP values of PLS-DA model of 16 batches of Huangzhi Yishen Capsules

药材,进一步说明黄芪药材对黄蛭益肾胶囊的质量影响较大。

### 3 讨论

本实验分别考察了超声提取方法的不同提取溶剂(50%甲醇、70%甲醇和甲醇)、提取时间(30、45、60 min)和提取料液比(1:5、1:10、1:15)等影响因素,从提取的色谱信息全面性、色谱峰的响应、操作便捷性等方面考虑,确定供试品溶液最佳制备方法为加10倍量甲醇超声提取30 min。比较了4种不同流动相系统(甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05%磷酸水、乙腈-0.1%磷酸水),乙腈-0.05%磷酸水作为流动相所得色谱峰形、响应及分离度均较好;采用DAD检测器对检测波长进行考察,发现在210 nm处的图谱信息较多,峰响应较高;由于样品中极性大的成分较多,优先考虑亲水性型色谱柱,分别选择Waters Atlantis T3(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Inter Sustain AQ-C<sub>18</sub>(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Waters Symmetry Shield RP18(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Waters XBridge<sup>®</sup> Shield RP18(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m),同一色谱条件下进样,结果表明Waters XBridge<sup>®</sup> Shield RP18(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m)色谱柱的分离效果较好,峰数量较多且分离度较好,故采用该款色谱柱。

本研究建立了黄蛭益肾胶囊的指纹图谱,16批样品中确定24个共有峰,通过HPLC-Q-TOF-MS/MS鉴定了化合物,并通过阳性药材和阴性制剂样品比对归属到7味药材。相似度评价结果表明16批黄蛭益肾胶囊相似度在0.925~0.995,总体上质量较为均一。但通过HCA、PCA和PLS-DA化学模式分析,16批黄蛭益肾胶囊共有峰峰面积存在差异,从而造成样品之间的质量差异。通过聚类图可知,16批样品被分为3类,结合样品批号信息,3类

间的差异可能与生产时间、药品储存、原药材质量有关。以PLS-DA模型中的VIP值选出8种差异性成分,可作为控制黄蛭益肾胶囊质量的关键,这几种成分分别来自黄芪、三七、杜仲、益母草、墨旱莲,提示生产企业以后在药品生产中应该着重关注以上成分的变化以及这几味原药材的质量。

本实验操作简单,可行性高,实用性强,基于指纹图谱的基础上初步分析了药品物质基础,为黄蛭益肾胶囊所含成分的进一步分析奠定基础,为更加科学、高效地控制药品质量提供参考依据。黄蛭益肾胶囊所含药味众多,本实验指纹图谱归属到的药材仅7味,还有枸杞、薏苡仁、山药等<sup>[21-23]</sup>药材成分未在此指纹图谱结果中体现,主要是由于这类药材所包含成分多为水溶性等大极性成分,色谱分离难度较大,针对此类化合物的分析后续拟采用HILIC模式<sup>[24]</sup>进行分析。黄蛭益肾胶囊中的黄芪、牛膝、三七等药材同样包含大量皂苷类成分,此类成分在紫外中没有吸收,日后可结合蒸发光散射(ELSD)或电喷雾(CAD)检测器开展其成分分析,以期完善其成分分析。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准 [S]. WS3-755(Z-41)-2005(Z). State Food and drug administration. National Drug Standards [S]. WS3-755(Z-41)-2005(Z).
- [2] 林静, 郭敏, 郭伟杰, 等. 黄蛭益肾胶囊联合阿魏酸哌嗪治疗慢性肾小球肾炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(1): 113-117. Lin J, Guo M, Guo W J, et al. Clinical study on Huangzhi Yishen Capsules combined with piperazine ferulate in treatment of chronic glomerulonephritis [J]. Drugs Clin, 2020, 35(1): 113-117.
- [3] 罗静, 李胜, 赵春艳. 黄蛭益肾胶囊治疗肾病综合征型IgA肾病临床疗效分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(95): 17-18. Luo J, Li S, Zhao C Y. Clinical effect evaluation and analysis of leech kidney tonifying capsule in treatment of IgA nephropathy with nephrotic syndrome [J]. World Lat Med Inform, 2019, 19(95): 17-18.
- [4] 郝剑, 于为民. I~II期特发性膜性肾病治疗方案中联合黄蛭益肾胶囊的临床效果 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2017, 18(7): 620-621. Hao J, Yu W M. Clinical effect of Huangzhi Yishen Capsule in the treatment of stage I ~ II idiopathic membranous nephropathy [J]. Chin J Integ Tradit West Nephrol, 2017, 18(7): 620-621.
- [5] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094. Liu D F, Zhao L N, Li Y F, et al. Research progress and application in fingerprint technology on Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [6] 祝明, 陈碧莲, 石上梅. 中药指纹图谱技术在中国药典2015年版一部中的应用 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 611-614. Zhu M, Chen B L, Shi S M. Application of fingerprint technology on traditional Chinese medicine in Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition) Volume I [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2016, 33(5): 611-614.
- [7] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345. Sun L L, Wang M, Ren X L. Application progress on chemical pattern recognition in quality control of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [8] 孙国祥, 闫波, 侯志飞, 等. 中药色谱指纹图谱评价方法研究进展 [J]. 中南药学, 2015, 13(7): 673-681. Sun G X, Yan B, Huo Z F, et al. Advances in evaluating chromatographic fingerprints of traditional Chinese medicine [J]. Cent South Pharm, 2015, 13(7): 673-681.
- [9] 王露露, 孙倩怡, 杨慧海, 等. 模式识别及其在中药质量评价中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4282-4288. Wang L L, Sun Q Y, Yang H H, et al. Pattern recognition and its application in quality assessment of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(23): 4282-4288.
- [10] 游梦, 夏梦棋, 于亚云, 等. 基于指纹图谱结合多成分化学模式分析的复方垂盆草降酶颗粒质量控制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(21): 2610-2616. You M, Xia M Q, Yu Y Y, et al. Quality control research of Compound Chuipencao decreasing enzyme granules based on fingerprint combined with multi-components chemical pattern analysis [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37(21): 2610-2616.
- [11] 李江, 李娇, 付鹏, 等. 基于化学模式识别技术提升参威骨痹片的质量标准并监测其生产中质控指标的转移率变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(15): 130-136. Li J, Li J, Fu P, et al. Improvement of quality standard of Shenwei Gubi Tablets and changes of transfer rates of its quality control indicators in production based on chemical pattern recognition technology [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(15): 130-136.

- [12] 丁若雯, 宋细忠, 魏惠珍, 等. 基于指纹图谱技术的车前子与混伪品的鉴别研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(9): 1097-1103.  
Ding R W, Song X Z, Wei H Z, et al. Identification of plantaginins semen from counterfeits based on fingerprint technology [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 31(9): 1097-1103.
- [13] 雒晓梅, 宿美凤, 常晓燕, 等. 基于LC-MS联用的杜仲主要化学成分定性及定量分析 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(8): 1029-1040.  
Luo X M, Su M F, Chang X Y, et al. Qualitative and quantitative analysis of main chemical constituents in eucommia ulmoides by LC-MS [J]. Mod Chin Med, 2019, 21(8): 1029-1040.
- [14] 邓云锋, 钟询龙, 张春梅. 墨旱莲化学成分的UPLC/Q-TOF-MS分析 [J]. 广东药学院学报, 2015, 31(3): 332-337.  
Deng Y F, Zhong X L, Zhang C M. Analysis on chemical components of *Eclipta prostrata* by ultra performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS) [J]. Acad J Guangdong Coll Pharm, 2015, 31(3): 332-337.
- [15] 谭亚杰, 濮宗进, 唐于平, 等. 基于UPLC-QTRAP<sup>®</sup>/MS<sup>2</sup>方法评价不同干燥方式对益母草中化学成分的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1576-1586.  
Tan Y L, Pu Z J, Tang Y P, et al. Effects of different drying methods on multiple chemical components in *Leonurus japonicus* based on UPLC-QTRAP<sup>®</sup>/MS<sup>2</sup> [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(7): 1576-1586.
- [16] 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.  
Xu R L, Fang J J, Dong H M, et al. UPLC-Q-TOF-MS analysis on chemical constituents of classical prescription Huangqi Guizhi Wuwu Tang standard decoction [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(23): 5614-5630.
- [17] 王胜男, 徐新, 刘训红. 基于超快速液相-串联四极杆飞行时间高分辨质谱技术分析不同产地玄参化学成分的差异 [J]. 中国药理学杂志, 2019, 54(9): 741-748.  
Wang S N, Xu X, Liu X H. Analysis of differential chemical constituents in *Scrophulariae Radix* from different areas using UFLC-Triple TOF-MS/MS [J]. Chin Pharm J, 2019, 54(9): 741-748.
- [18] 赵静, 秦振娟, 彭冰, 等. 基于UPLC-Q-TOF MS技术的三七中皂苷类成分质谱裂解规律研究 [J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 97-108.  
Zhao J, Qin Z X, Peng B, et al. Fragmentation pathway of ginsenosides in *Panax notoginseng* using electrospray ionization-quadrupole/time-of-flight mass spectrometer [J]. J Chin Mass Spect Soc, 2017, 38(1): 97-108.
- [19] 张纪红, 吴卫东, 刘建庭, 等. 基于UPLC-Q-TOF/MS技术活血止痛胶囊化学成分的快速分析 [J]. 中草药, 2020, 51(12): 3139-3146.  
Zhang J H, Wu W D, Liu J T, et al. Rapid analysis of chemical constituents of Huoxue Zhitong Capsules based on UPLC-Q-TOF/MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(12): 3139-3146.
- [20] 高家荣, 朱梦情, 汪小莉, 等. UPLC-Q-TOF-MS<sup>E</sup>技术结合UNIFI软件分析黄地安消胶囊化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(10): 2395-2405.  
Gao J R, Zhu M Q, Wang X L, et al. Identification of chemical constituents in Huangdi Anxiao Capsules by UPLC-Q-TOF-MS<sup>E</sup> combined with UNIFI software [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(10): 2395-2405.
- [21] 李建学, 樊祥富, 刘学龙, 等. 枸杞化学成分及其药理作用的研究进展 [J]. 食品安全导刊, 2016(24): 75.  
Li J X, Fan X F, Liu X L, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Lycium barbarum* L. [J]. China Food Saf Mag, 2016(24): 75.
- [22] 陈梦雨, 刘伟, 俞桂新, 等. 山药化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中医药学报, 2020, 48(2): 62-66.  
Chen M Y, Liu W, Chou G X, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Dioscorea opposita* Thunb. [J]. J Chin Med Pharmacol, 2020, 48(2): 62-66.
- [23] 李晓凯, 顾坤, 梁慕文, 等. 薏苡仁化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5645-5657.  
Li X K, Gu K, Lian M W, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Coicis Semen* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(21): 5645-5657.
- [24] 徐露露, 陈路晓, 骆宜, 等. 亲水作用色谱在天然产物分离分析中的应用进展 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(9): 1516-1525.  
Xu L L, Chen L X, Luo Y, et al. Application progress of hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation and analysis of natural products [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(9): 1516-1525.

[责任编辑 兰新新]