

UPLC-Q-TOF-MS 联用研究不同厂家前列癃闭通片指纹图谱

崔璐¹, 褚征¹, 康廷国², 赵庆春¹, 康烨^{1*}

1. 北部战区总医院, 辽宁 沈阳 110023

2. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600

摘要: **目的** 通过建立前列癃闭通片(Qianlielong Bitong Tablets, QBT)的 UPLC 指纹图谱,考察了 9 个厂家 58 批次 QBT 的质量,为完善该制剂的质量控制奠定基础。**方法** 采用 UPLC 法,色谱柱 Eclipse Plus C₁₈ RRHD(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱,采用全时段多波长融合技术,体积流量 0.3 mL/min;柱温 30 ℃。建立 QBT 的指纹图谱,并对各样品的指纹图谱进行相似度评价,结合聚类分析评价 58 批样品的质量,指认了指纹图谱中主要共有峰的化学成分并确定了其药材归属。**结果** 首次建立 QBT 的 UPLC 指纹图谱,对其中 16 个共有峰进行了化学成分鉴定,分别是辛弗林(1 号峰)、虎杖苷(2 号峰)、金丝桃苷(3 号峰)、新圣草苷(4 号峰)、柚皮苷(5 号峰)、橙皮苷(6 号峰)、新橙皮苷(7 号峰)、枸橼苷(8 号峰)、朝藿定 A(9 号峰)、朝藿定 B(10 号峰)、朝藿定 C(11 号峰)、淫羊藿苷(12 号峰)、芒柄花素(13 号峰)、宝藿苷(14 号峰)、大黄素(15 号峰)、大黄素甲醚(16 号峰),确定了 16 个特征峰来源于方中 4 味中药,峰 1、4~8 归属枳壳药材,峰 2、3、15、16 归属虎杖药材,峰 9~12、14 归属淫羊藿药材,峰 13 归属黄芪药材。对 9 个生产企业 58 批次样品进行相似度评价,相似度分布在 0.600~0.912,通过聚类分析大致可聚为 4 类。**结论** 建立 QBT 的指纹图谱,该方法简便、可靠,为进一步评价和监测 QBT 的质量提供参考。

关键词: UPLC-Q-TOF-MS; 前列癃闭通片; 质量评价; 指纹图谱; 相似度; 聚类分析; 全时段多波长融合技术; 辛弗林; 虎杖苷; 金丝桃苷; 新圣草苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 枸橼苷; 朝藿定; 淫羊藿苷; 芒柄花素; 宝藿苷; 大黄素; 枳壳; 虎杖; 淫羊藿; 黄芪

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)24-7493-08

DOI 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.011

Fingerprint of Qianlie Longbitong Tablets from different manufacturers by UPLC-Q-TOF-MS

CUI Lu¹, CHU Zheng¹, KANG Ting-guo², ZHAO Qing-chun¹, KANG Ye¹

1. General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110032, China

2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To establish an UPLC fingerprint of Qianlielong Bitong Tablets (前列癃闭通片, QBT) for quality evaluation of 58 batches of QBT from nine different manufacturers, so as to support the foundation of quality control system of the tablets. **Methods** The method was performed by UPLC with Eclipse Plus C₁₈ RRHD (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column; acetonitrile-0.1% formic acid aqueous as the mobile phase for gradient elution, with the all-time multi-wavelength fusion. The flow rate was 0.3 mL/min, column temperature was 30℃. The HPLC fingerprint was established and evaluated by the similarity evaluation system of QBT, the quality of 58 batches of samples was evaluated by cluster analysis. The chemical constituents of the main common peaks were identified in the fingerprint and attributed to raw materials. **Results** The UPLC fingerprint of QBT was developed firstly, the chemical constituents of 16 common peaks were identified, including synephrine (peak 1), polydatin (peak 2), hyperoside (peak 3), neoeriocitrin (peak 4), naringin (peak 5), hesperidin (peak 6), neohesperidin (peak 7), poncirin (peak 8), epimedin A (peak 9), epimedin B (peak 10), epimedin C (peak 11), icariin (peak 12), formononetin (peak 13), baohuoside (peak 14), emodin (peak 15), physcion (peak 16), and the 16 characteristic peaks were determined from four traditional Chinese medicines. The peaks 1, 4—8 were attributed to Zhiqiao (*Aurantii Fructus*), the peaks 2, 3, 15, 16 *Astragali Radix* to Huzhang (*Polygoni Cuspidati Rhizoma* et

收稿日期: 2021-06-28

作者简介: 崔璐,女,硕士,主管中药师,研究方向中药鉴定与品质评价。E-mail: 1031706465@qq.com

*通信作者: 康烨,女,硕士,主管药师,研究方向临床药理。E-mail: liushixun0822@163.com

Radix), the peaks 9—12, 14 *Astragali Radix* to *Yinyanghuo (Epimedii Folium)*, the peak 13 *Astragali Radix* to *Huangqi (Astragali Radix)*. The analyzed samples were geographically classified into four classes with the similarities between 0.600—0.912. **Conclusion** The fingerprint of QBT was developed, the method is simple and reliable. It provides reference for further evaluation and monitoring the quality of QBT.

Key words: UPLC-Q-TOF-MS; Qianlielong Bitong Tablets; quality evaluation; fingerprint; similarity; cluster analysis; all-time multi-wavelength fusion; synephrine; polydatin; hyperoside; neoeriocitrin; naringin; hesperidin; poncirin; epimedin; icariin; formononetin; baohuoside; emodin; *Aurantii Fructus*; *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*; *Epimedii Folium*; *Astragali Radix*

前列癃闭通片 (Qianlielong Bitong Tablets, QBT) 收载于《国家中成药标准汇编》内科肾系分册, 是在复方前列癃闭胶囊的基础上改剂型而成的现代中药制剂。本方以黄芪为君药, 桂枝、土鳖虫、冬葵果、桃仁、淫羊藿为臣药, 柴胡、茯苓、枳壳、虎杖、川牛膝为佐药, 共 11 味药材经水煎煮、浓缩等工艺精制而成, 具有益气温阳、活血利水的功效, 临床用于治疗肾虚血瘀所致的癃闭, 症见尿频、排尿延缓、费力、尿后余沥、腰膝酸软, 亦可用于具有上述症候的慢性前列腺炎^[1-2]和良性前列腺增生^[3-4]的患者。

目前全国有 11 家生产企业生产 QBT, 生产企业较多且无统一标准, 虽各生产企业的处方以及生产工艺相同, 但是各生产企业的药品质量有较大差别, 可能是受到原料药来源、生产工艺参数等众多因素影响。为了评价该药质量的一致性, 并最大限度地表征 QBT 的特征成分, 本实验以抽检的 9 个生产企业共 58 批不同批号的 QBT 为对象, 首次建立其 UPLC 指纹图谱, 并对指纹图谱中的主要特征峰进行化学成分的指认, 以及组方中药来源的初步确定。通过计算相似度和聚类分析, 对各生产企业各批次样品进行质量评价, 为完善 QBT 的质量控制奠定基础, 保证该药的临床疗效。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1290 超高效液相色谱仪、二极管阵列检测器 (DAD)、Agilent 6550 精确质量四极杆飞行时间 (Q-TOF) LC/MS 系统, 美国安捷伦公司; HS6150 型超声波清洗器, 天津恒奥科技发展有限公司; Milli-Q 超纯水处理装置, 美国 Millipore 公司; Sartorius CP225D 型电子分析天平, 北京赛多利斯天平有限公司; SHZ-DIII 型循环水式真空泵, 巩义市予华仪器有限责任公司。

1.2 试药与试剂

对照品辛弗林 (批号 110727-201107)、虎杖苷 (批号 111575-200502)、金丝桃苷 (批号

111521-201406)、柚皮苷 (批号 110722-201312)、橙皮苷 (批号 110721-201316)、新橙皮苷 (批号 111857-201102)、朝藿定 C (批号 111780-201302)、淫羊藿苷 (批号 110737-200415)、芒柄花素 (批号 111703-200603)、宝藿苷 (批号 111852-201102)、大黄素 (批号 110756-200110)、大黄素甲醚 (批号 110758-201013) 均购自中国食品药品检定研究院, 质量分数均 $\geq 98\%$; 对照品朝藿定 A (批号 GZDD-0477)、朝藿定 B (批号 GZDD-0478) 均购自贵州迪大生物科技有限责任公司, 质量分数均 $\geq 98\%$; 对照品新圣草苷 (批号 A0032) 购于成都曼斯特生物有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$; 对照品枸橼苷 (批号 p114052) 购于 Aladdin-阿拉丁试剂 (上海) 有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$ 。

药材黄芪为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根 (批号 120974-201311)、虎杖为蓼科虎杖属植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根 (批号 120980-201005)、桃仁为蔷薇科桃属植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子 (批号 120953-201106)、川牛膝为苋科杯苋属植物川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan 的干燥根 (批号 121065-201105)、枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥未成熟果实 (批号 120981-201104)、桂枝为樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝 (批号 121191-201304)、茯苓为多孔菌科茯苓属真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核 (批号 121117-201308)、柴胡为伞形科柴胡属植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根 (批号 120992-201108)、淫羊藿为小檗科淫羊藿属植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 的干燥叶 (批号 121632-201101)、土鳖虫为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 的雌虫干燥体 (批号 121533-200702), 均购自中国食品药品检定研究院; 冬葵果采摘于本溪怀仁县, 为锦葵科甜菜属植物冬葵 *Malva verticillata* L.

的干燥成熟果实；以上药材均由辽宁省检验检测认证中心中药室王维宁主任中药师鉴定。

供试品覆盖全国 26 个省共 9 个生产企业的 58 批 QBT，分别是吉林百琦药业有限公司（BQ）、长春新安药业有限公司（CC）、吉林吉尔吉药业有限

公司（JEJ）、沈阳神龙药业有限公司（SL）、陕西华西制药有限公司（SX）、武汉健民药业集团股份有限公司（WH）、江苏万高药业有限公司（WG）、药圣堂（湖南）制药有限公司（YST）、江苏颐海药业有限公司（YH），见表 1。

表 1 QBT 样品的信息

Table 1 Information of QBT

序号	批号	序号	批号	序号	批号	序号	批号	序号	批号
BQ-A	20150701	BQ-K	20150702 070	JEJ-D	20150301	SX-C	150601	WG-E	1501302
BQ-B	20150102 043	BQ-L	20150102 008	JEJ-E	20140701	WH-A	150302	WG-F	1501301
BQ-C	20140901	CC-A	20140701	JEJ-F	20141101	WH-B	150604	WG-G	1501303
BQ-D	20150102 027	CC-B	20150301	SL-A	20150402	WH-C	150603	WG-H	1404032
BQ-E	20140601	CC-C	20140702	SL-B	20150401	WH-D	150301	YST-A	150101
BQ-F	20150103 064	CC-D	20130501	SL-C	20130601	WH-E	150601	YST-B	140702
BQ-G	20150601	CC-E	20150302	SL-D	20130101	WG-A	1504221	YST-C	140501
BQ-H	20141201	JEJ-A	20141001	SL-E	20150101	WG-B	1504222	YST-D	140601
BQ-I	20150102 016	JEJ-B	20150302	SX-A	141101	WG-C	1407112	YST-E	140701
BQ-J	20150703 003	JEJ-C	20140301	SX-B	150301	WG-D	1412021	YST-F	150601

乙腈，质谱级，德国默克集团；甲醇，色谱级，Fisher 公司；甲酸，质谱级，赛默飞世尔公司；娃哈哈纯净水，杭州娃哈哈集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取 QBT 20 片，除去薄膜衣，称定质量，研细，取 0.5 g，精密称定，精密加入 50% 甲醇溶液 25 mL，称定质量，超声处理（功率 300 W、频率 50 kHz）45 min，放冷，再称定质量，用 50% 甲醇溶液补足减失的质量，滤过，取续滤液，即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 取辛弗林、金丝桃苷、虎杖苷、新圣草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橼苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、芒柄花素、宝藿苷、大黄素、大黄素甲醚对照品适量，加 50% 甲醇溶液 1 mL，超声 10 min，滤过，即得混合对照品溶液。

2.1.3 各药材供试溶液的制备 取黄芪、土鳖虫、冬葵果、虎杖、枳壳、柴胡、川牛膝、桂枝、淫羊藿、桃仁、茯苓药材粉末，分别按照其在处方中的投料量折算后取样，按“2.1.1”项下方法制备，作为各原料药材对照溶液。

2.2 UPLC 色谱条件

色谱柱为 Eclipse Plus C₁₈ RRHD（50 mm×2.1 mm，1.8 μm）；流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液，梯

度洗脱：0~5 min，2% 乙腈；5~9 min，2%~10% 乙腈；9~12 min，10%~15% 乙腈；12~19 min，15% 乙腈；19~30 min，15%~26% 乙腈；30~36 min，26%~36% 乙腈；36~43 min，36%~50% 乙腈；43~48 min，50%~80% 乙腈；48~49 min，80%~95% 乙腈；49~51 min，95% 乙腈；检测波长 248、270、283、290、306 nm，体积流量 0.3 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 3.5 μL。理论板数按淫羊藿苷色谱峰计算应不低于 1500。

2.3 MS 分析条件

2.3.1 一级质谱条件 电喷雾离子源，采用正离子模式检测，干燥气体体积流量为 11 L/min，干燥气体温度为 250 ℃，毛细管电压为 4000 V，雾化器压力为 0.30 MPa，碎裂电压为 365 V，质量扫描范围为 m/z 100~1500。

2.3.2 二级质谱条件 电喷雾离子源，正离子模式检测，干燥气体温度为 325 ℃，干燥气体体积流量为 6 L/min，雾化器压力 0.30 MPa，鞘气气体温度为 400 ℃，鞘气气体体积流量为 12 L/min，毛细管电压 4000 V，Q-TOF 碎裂电压 365 V，质量扫描范围 m/z 50~2500。

2.4 全时段多波长指纹图谱融合方法

采用 DAD 二极管阵列检测器对 QBT 在 200~400 nm 对混合对照品进行扫描，选择能够满足所有活性成分的峰面积最大值，经过扫描得到波长确定

为 248、270、283、290、306 nm。根据文献采用全时段多波长融合技术^[5], 分别从 Agilent 1290 色谱工作站中导出 248、270、283、290、306 nm 的 dif 格式数据文件, 使用 Matlab 软件编程, 对 dif 格式数据进行全时段多波长融合, 得到同时反映 5 个波长信息的色谱图。

2.5 指纹图谱方法学考察

根据上述“2.2”项下方法对 9 个生产企业 58 批次 QBT 进行测定, 并对其精密度、稳定性、重复性进行考察。以相对独立的 12 号峰(淫羊藿苷)作为参比峰, 对其他峰的相对保留时间和相对峰面积进行计算。

2.5.1 精密度考察 取 BQ-D 样品按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 测定并记录色谱图, 以 12 号峰为参照峰, 该峰为所有样品共有且峰面积较大、分离较好, 考察各主要色谱峰与参比峰相对保留时间和相对峰面积的一致性, 计算相应 RSD 值, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD < 1.0%, 相对峰面积的 RSD < 3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性考察 取 BQ-D 供试品溶液, 按“2.2”

项下色谱条件, 分别在供试品溶液制备后的 0、2、4、6、12、24 h 重复进样 6 次, 结果各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.03%~0.67%, 相对峰面积的 RSD 在 0.29%~3.33%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.3 重复性考察 按“2.1.1”项下方法制备 6 份 BQ-D 供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进行测定。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 在 0.30%~2.30%, 相对峰面积的 RSD 在 0.30%~2.81%, 说明方法重复性良好。

2.6 指纹图谱的建立及相似度的计算

将 58 批 QBT 样品按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按上述“2.2”项下色谱条件进行测定, 结果 16 个峰为 QBT 的共有峰, 且这些峰的峰面积总和占总峰面积的 90%以上。对所得出的 58 批样品指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版”进行分析, 9 个生产企业样品的指纹图谱以 BQ-D 样品图谱作为相似度计算校正的参照谱, 采用中位数法生成对照图谱(R), 各厂家部分代表性批次样品的指纹图谱见图 1, 计算各厂家各批次与对照指纹图谱的相似度, 结果见表 2。

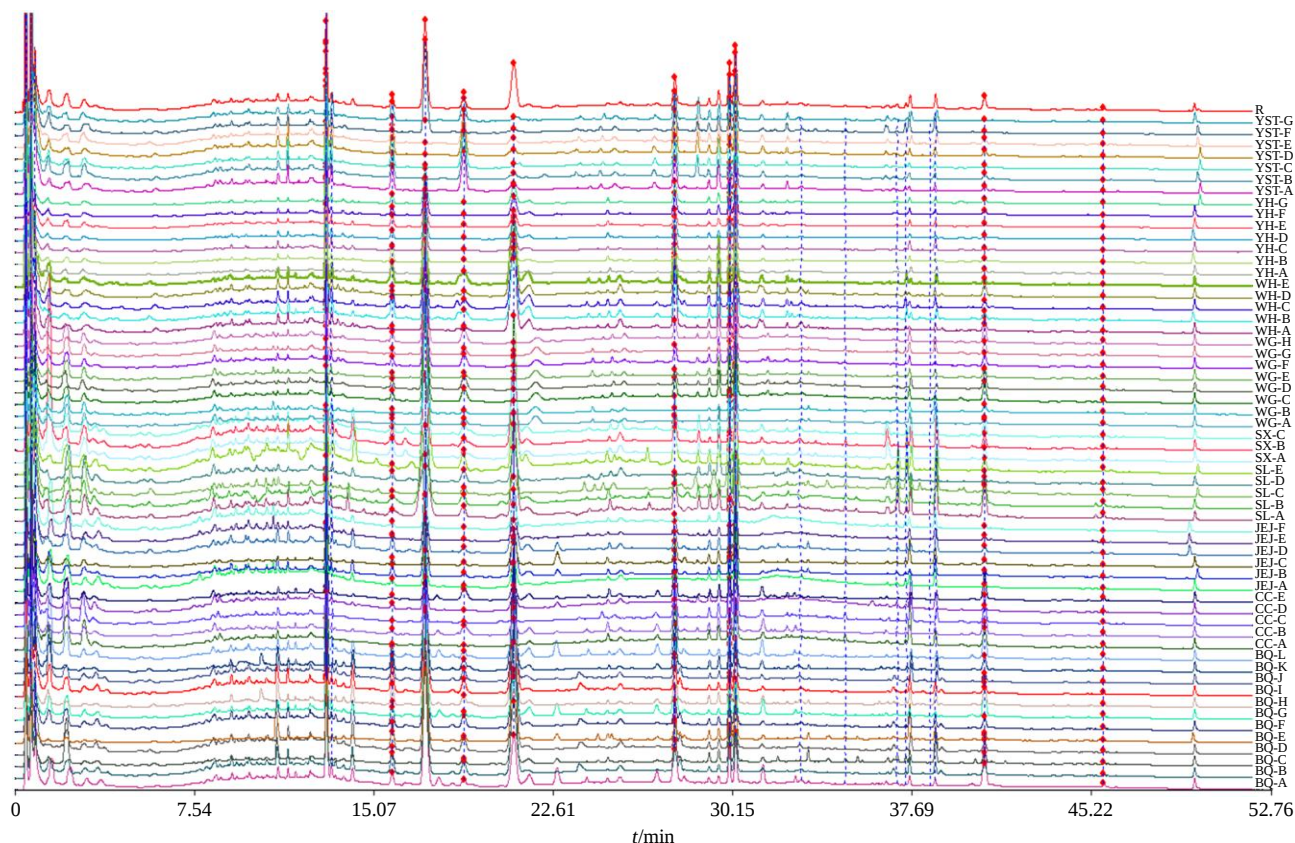


图 1 58 批次 QBT UPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprints of 58 batches of QBT

表 2 各样品 UPLC 指纹图谱的相似度

Table 2 Similarities of UPLC fingerprint of each sample

序号	相似度	序号	相似度	序号	相似度	序号	相似度
BQ-A	0.866	CC-D	0.636	SX-C	0.905	YH-B	0.600
BQ-B	0.859	CC-E	0.711	WG-A	0.725	YH-C	0.653
BQ-C	0.824	JEJ-A	0.762	WG-B	0.686	YH-D	0.643
BQ-D	0.876	JEJ-B	0.829	WG-C	0.654	YH-E	0.714
BQ-E	0.874	JEJ-C	0.736	WG-D	0.549	YH-F	0.697
BQ-F	0.861	JEJ-D	0.773	WG-E	0.692	YH-G	0.722
BQ-G	0.912	JEJ-E	0.762	WG-F	0.719	YST-A	0.878
BQ-H	0.849	JEJ-F	0.710	WG-G	0.742	YST-B	0.868
BQ-I	0.860	SL-A	0.873	WG-H	0.670	YST-C	0.864
BQ-J	0.892	SL-B	0.882	WH-A	0.775	YST-D	0.844
BQ-K	0.772	SL-C	0.835	WH-B	0.761	YST-E	0.842
BQ-L	0.909	SL-D	0.765	WH-C	0.761	YST-F	0.852
CC-A	0.687	SL-E	0.732	WH-D	0.756	YST-G	0.888
CC-B	0.706	SX-A	0.843	WH-E	0.596		
CC-C	0.688	SX-B	0.812	YH-A	0.682		

2.7 QBT 共有峰确认和归属

2.7.1 指纹图谱药材归属分析 根据 QBT 的生产工艺,将处方中的 11 味药材均经水煎,浓缩。再分别根据“2.1.3”项各药材对照品溶液制备方法制备,按“2.2”项下色谱条件测定。根据紫外光谱信息,对全方与药材指纹图谱中的相关峰进行归属,确认峰 1、4~8 归属枳壳药材,峰 2、3、15、16 归属虎杖药材,峰 9~12、14 归属淫羊藿药材,峰 13 归属黄芪药材(图 2)。其余原料药材的色谱图在此检测条件下信息量较少,有待进一步研究。

2.7.2 对照品法指认各共有峰 取“2.1.2”混合对照品进样,按“2.2”项下色谱条件测定。结果见图 2。通过与样品色谱图比较对照品的保留时间并扫描对比其紫外吸收光谱,从而初步猜测 1 号峰为辛弗林,2 号峰为虎杖苷,3 号峰为金丝桃苷,4 号峰为新圣草苷,5 号峰为柚皮苷,6 号峰为橙皮苷,7 号峰为新橙皮苷,8 号峰为枸橼苷,9 号峰为朝藿定 A,10 号峰为朝藿定 B,11 号峰为朝藿定 C,12 号峰

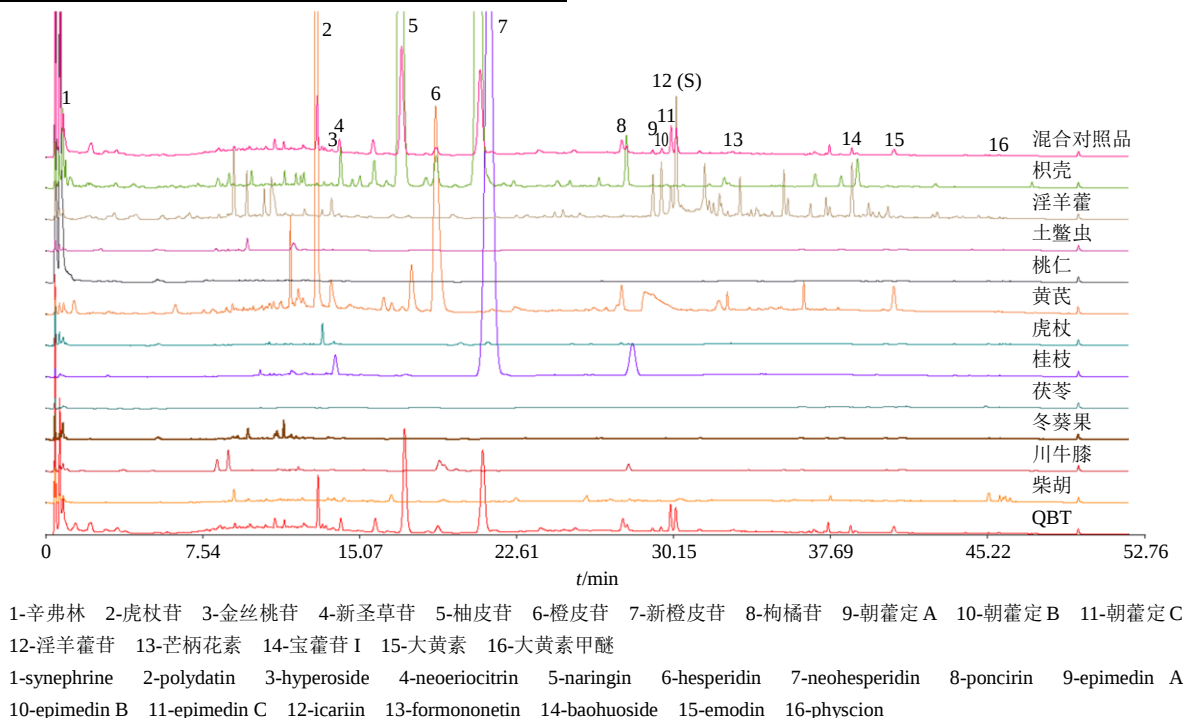


图 2 QBT 及其处方中 11 味单味药材以及混合对照品的 UPLC 图谱

Fig. 2 UPLC fingerprints of QBT and 11 single medicinal herbs in prescription and mixed reference substances

为淫羊藿苷,13 号峰为芒柄花素,14 号峰为宝藿苷 I,15 号峰为大黄素,16 号峰为大黄素甲醚。

2.7.3 UPLC-Q-TOF-MS 指认各色谱峰 为进一步阐明 QBT 指纹图谱表征的化学成分,采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对色谱峰进行确认。由于 QBT 的处方药味多,化学成分差别较大,故同时采用正、负离

子模式进行扫描见图 3,从图 3 中可以看出负离子流图离子峰较少,正离子流图都能涵盖,所以最终采用正离子模式。通过质谱中分子离子峰和碎片离子峰的信息,结合紫外吸收光谱特征,与相关文献报道以及对对照品进行对照,鉴定了 QBT 指纹图谱中 16 个色谱峰,结果见表 3。

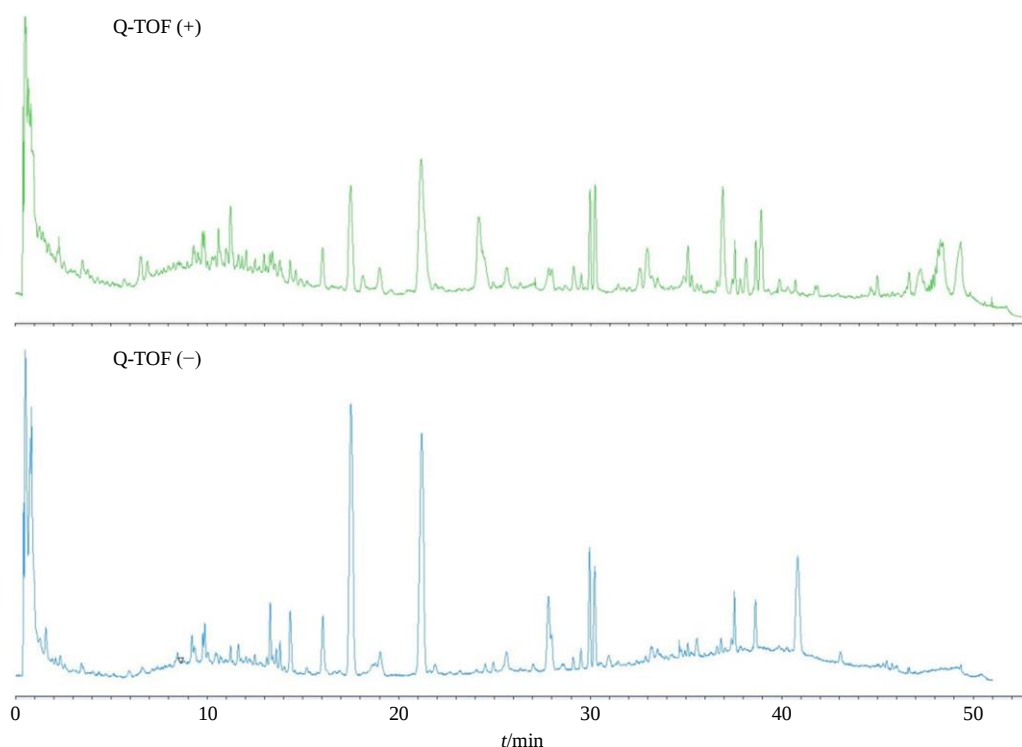


图 3 QBT 样品的总离子流图

Fig. 3 Total ionic chromatogram of QBT

表 3 QBT 的 UPLC-MS 分析结果

Table 3 UPLC-MS analytic results of QBT

色谱峰	tr/min	归属药材	化合物	相对分子 质量	准分子离子峰 (m/z)		
					$[M-OH]^-$	$[M+Na]^+$	$[M+H]^+$
1	0.726	枳壳	辛弗林	167.21	150.103 6	—	—
2	13.345	虎杖	虎杖苷	390.38	—	413.132 7	—
3	14.014	虎杖	金丝桃苷	464.38	—	487.091 8	—
4	14.367	枳壳	新圣草苷	596.00	—	619.168 6	—
5	17.504	枳壳	柚皮苷	580.53	—	603.170 6	—
6	19.039	枳壳	橙皮苷	610.56	—	633.185 3	—
7	21.182	枳壳	新橙皮苷	610.56	—	633.187 5	—
8	27.721	枳壳	枸橼苷	594.56	—	617.188 2	—
9	29.113	淫羊藿	朝藿定 A	838.80	—	861.281 5	—
10	29.511	淫羊藿	朝藿定 B	808.00	—	831.271 9	—
11	29.964	淫羊藿	朝藿定 C	822.00	—	845.287 3	—
12	30.251	淫羊藿	淫羊藿苷	676.00	—	—	677.250 2
13	32.211	黄芪	芒柄花素	268.00	—	—	269.090 5
14	38.645	淫羊藿	宝藿苷 I	514.00	—	537.181 4	—
15	40.877	虎杖	大黄素	270.00	—	—	271.073 0
16	45.863	虎杖	大黄素甲醚	284.00	—	—	285.039 7

2.8 样品数据聚类分析

将各生产企业 QBT 样品指纹图谱的 16 个共有峰相对于参照峰 12 号, 采用 SPSS 19.0 软件对所有

QBT 样品进行系统聚类分析。采用组间连接法, 利用平方 Euclidean 距离 (squared Euclidean distance) 为测度, 计算不同样品间相似程度, 结果见图 4。

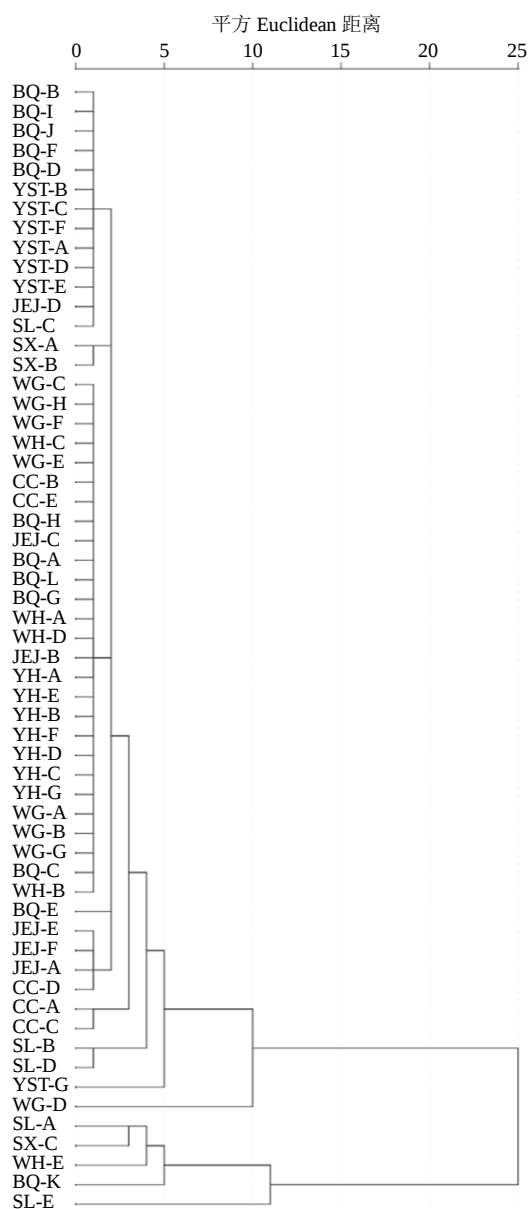


图 4 QBT 的聚类分析图

Fig. 4 Cluster analysis of QBT

聚类分析将不同厂家的样品大致分为 4 类：一类包括生产企业为 BQ、SL、SX、YST 的样品，其相似度高，一般大于 0.8；二类包括生产企业 WG、WH、CC、YH 的样品，该类相似度相对较低在 0.6~0.7；三类包括生产企业 JEJ、CC 的样品，该类样品相似度不高且较分散，质量差异性较大；四类包括生产企业有 WH、WG、SL、BQ、SX 的个别的样品，该类为个别生产企业相似度较低的分在这一组。WG、WH、CC 的各批次样品较分散，表明这些企业的生产工艺不是十分稳定。同厂家的样品基本聚在同一类中，也有个别的企业分为几类，分类基本与不同的生产批号一致。聚类分析得到的样品

之间的相关性，与相似度计算得到的样品之间的相关性，结果较一致。聚类分析更能直观地看出各生产企业之间的区别。

3 讨论

3.1 实验条件的选择

本实验比较了回流和超声 2 种提取方法；提取溶剂考察了 50%乙醇、乙醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇 5 种提取溶剂；溶剂用量考察了 25、50 mL；以及超声时间 15、30、45、60 min 进行了考察，结果表明采用 25 mL 50%甲醇超声处理 45 min 即可完全提取。分别考察了甲醇-水系统，乙腈-水系统，乙腈-0.1%甲酸水，乙腈-0.5%甲酸水 4 个溶液系统，最终选择乙腈-0.1%甲酸水系统。指纹图谱的检测波长选用 248、270、283、290、306 nm 5 个波长进行全时段融合。

3.2 相似度及聚类分析

对所测 9 个生产企业样品的 UPLC 指纹图谱进行比较，实验结果表明，指纹图谱相似度结果与聚类分析的结果基本一致。BQ、SL、SX、YST 4 个生产企业样品相似度较高，质量一致性较好；WG、WH、CC 3 个生产企业样品指纹图谱的相似度较分散，主要考虑与样品的生产工艺参数不稳定或原料药的质量稳定性相关，导致生产批号较远的样品质量差异明显。而另有 JEJ、YH 生产企业样品指纹图谱的相似度低也有分散，与其他厂家的样品指纹图谱比较发现，其色谱图中来源于枳壳中的柚皮苷和新橙皮苷的含量较低。

3.3 化学成分指认分析

本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对 QBT 进行定性的分析。通过对一级、二级质谱中分子离子峰和碎片离子峰的信息进行分析，结合紫外吸收光谱特征，并与相关文献报道^[6-11]以及对照品进行对照，鉴定出了 QBT 指纹图谱中 16 个色谱峰。如总离子流色谱图中的 6 号峰橙皮苷 ($t_R=19.039$ min) 和 7 号峰新橙皮苷 ($t_R=21.182$ min) 在正离子模式下显示出相同的准分子离子峰 m/z 633.2 $[M+Na]^+$ 峰，二级质谱均产生 m/z 487.1 离子，应该为黄酮类苷元 $[Y_1+Na]^+$ 碎片离子峰， m/z 331.1 离子，应该为 $[B_2+Na]^+$ 碎片离子峰，但是 7 号峰新橙皮苷还存在 m/z 179.1 离子，应该为 $[A_0+H_2+H]^+$ 碎片离子峰，通过结合对照品对比以及查阅相关文献报道^[9]，故确认 6 号峰为橙皮苷，7 号峰为新橙皮苷。用类似方法其余 14 个色谱峰经 UPLC-Q-TOF-MS 分析均

与对照品的质谱裂解规律一致, 并且化学物质组主要包含 4 类有效组分, 分别为①黄酮类化合物: 1、4~14 号峰依次为辛弗林、新圣草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橼苷、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、芒柄花素、宝藿苷; ②二苯乙烯化合物: 2 号峰虎杖苷; ③黄酮醇苷类: 3 号峰金丝桃苷; ④蒽醌类化合物: 15 号峰大黄素和 16 号峰大黄素甲醚。QBT 的有效成分以黄酮类化合物为主要成分。

综上所述, 本实验以 QBT 为研究对象, 首次建立其 UPLC 指纹图谱, 指认了其中 16 个峰的化学成分, 并确定了这 16 个化学成分的归属药材。将建立的指纹图谱应用于 9 个生产厂家 58 批次样品的质量评价, 通过相似度计算, 发现不同厂家 QBT 的质量差异较大, 现行标准的质量控制内容难以保证临床疗效稳定, 而 UPLC 指纹图谱^[12-15]更全面表征不同厂家药品的质量信息, 较常规检验和单个成分定量测定, 更能全面反映该制剂质量的一致性和稳定性^[16-18], 对 QBT 的质量比较与评价有更积极的意义, 为保证临床用药的安全性、有效性和稳定性提供了方法和依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 潘骊. 中西医结合治疗慢性前列腺炎的临床效果及对患者免疫功能的影响研究 [J]. 中国医药指南, 2017, 15(22): 41-43.
- [2] Dun R L, Tsai J, Hu X H, et al. A systematic review of cross-cultural adaptation of the national institutes of health chronic prostatitis symptom index [J]. *Heal Qual Life Outcomes*, 2021, 19(1): 159.
- [3] 倪红辉, 陈海燕. 前列癃闭通片治疗良性前列腺增生 45 例 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 182-185.
- [4] 王春英, 王琳晶, 金泽, 等. 电针结合晶珠前列癃闭通胶囊治疗良性前列腺增生的临床观察 [J]. 针灸临床杂志, 2014, 30(7): 45-47.
- [5] 姚东, 孟宪生, 王帅, 等. 气滞胃痛颗粒全时段多波长融合指纹图谱研究及多成分定量分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(10): 1513-1517.
- [6] 陈黎, 黄良永, 叶方, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定虎杖中 9 种蒽醌类和 2 种二苯乙烯类化学成分的含量 [J]. 中南药学, 2020, 18(7): 1143-1146.
- [7] Sang Q N, Jia Q Q, Zhang H Y, et al. Chemical profiling and quality evaluation of Zhishi-Xiebai-Guizhi Decoction by UPLC-Q-TOF-MS and UPLC fingerprint [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, doi: 10.1016/j.jpba.2020.113771.
- [8] 于国华, 杨洪军, 李俊芳, 等. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术分析枳实中的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(18): 3371-3378.
- [9] 祝婧, 袁恩, 牟俊雍, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 分析江西特色炮制工艺对枳壳化学成分的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(16): 142-153.
- [10] 马文娟, 姚广哲, 贾琪, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 法定性分析淫羊藿中的化学成分 [J]. 中药材, 2019, 42(7): 1554-1559.
- [11] 谭雪霞, 朱宏明, 唐铖, 等. HPLC-MS 鉴定黄芩水煎液中黄酮类成分 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(2): 231-235.
- [12] Gao S M, Liu J S, Wang M, et al. Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [13] 吴琦, 宋粉云, 李华. UPLC-Q-TOF/MS 结合指纹图谱在抱龙丸质量控制中的应用 [J]. 中药材, 2021, 44(5): 1153-1158.
- [14] 何迅, 杨馨, 张锦, 等. UPLC-Q-TOF/MS 同时测定强力天麻杜仲胶囊中 5 种成分的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(8): 1140-1144.
- [15] 马莹, 郑伟然, 王振中, 等. 桂枝茯苓胶囊中三萜酸类成分的 UPLC/Q-TOF-MS 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 626-631.
- [16] 刘潇潇, 戴慧贤, 周颖仪, 等. 不同厂家香砂六君丸的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 67-72.
- [17] 倪术仁, 连云岚, 赵思俊, 等. 强力脑清素片 HPLC 指纹图谱的建立及质量标志物预测 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1011-1019.
- [18] 张闯, 陈世雨, 李葆林, 等. 蛇床子配方颗粒 HPLC 指纹图谱研究及 6 种香豆素类成分含量测定 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1530-1536.

[责任编辑 郑礼胜]