

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

金唯唯¹, 金华燕², 费状丽², 施杰², 白芮¹, 颜继忠¹, 张慧^{1*}

1. 浙江工业大学药学院中药研究所, 浙江 杭州 310014

2. 浙江爱诺生物药业股份有限公司, 浙江 湖州 313000

摘要: **目的** 建立补中益气产品 HPLC 指纹图谱, 并结合化学模式识别对相关样品(口服液、合剂、水丸、蜜丸、浓缩丸)进行质量标志物分析。**方法** 以 Kromasil 100-5-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱, 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液, 体积流量 0.80 mL/min, 检测波长 260 nm, 梯度洗脱; 对 20 批补中益气产品的 HPLC 指纹图谱进行相似度评价, 结合层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)对色谱峰进行综合处理和分析。**结果** 以补中益气产品 HPLC 指纹图谱中的 16 个色谱峰为共有峰, 20 批样品的相似度为 0.799~0.933; 指认其中 10 个共有峰。HCA、PCA、OPLS-DA 分类结果显示, 20 批补中益气产品可聚为 4 类, 补中益气浓缩丸聚为一类, 补中益气水丸聚为一类, 补中益气蜜丸聚为一类, 补中益气合剂与 11 批口服液聚为一类。OPLS-DA 筛选出变量投影重要性分析值(variable importance in projection, VIP)大于 1 的共有峰依次为峰 2(肌苷)、3(胸苷)、10(橙皮苷)、15(甘草酸)、6(毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷), 以上特征峰可作为补中益气产品的质量标志物。**结论** 建立的 HPLC 指纹图谱方法简便快捷, 专属性、重复性良好; 结合化学模式识别分析, 为补中益气产品质量评价标准体系的建立提供参考。

关键词: 补中益气产品; HPLC; 指纹图谱; 化学模式识别; 质量标志物; 口服液; 合剂; 水丸; 蜜丸; 浓缩丸; 层次聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 甘草酸; 橙皮苷; 肌苷; 胸苷; 毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)07-2114-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.011

Identification of quality markers of Buzhong Yiqi products based on HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition

JIN Wei-wei¹, JIN Hua-yan², FEI Zhuang-li², SHI Jie², BAI Rui¹, YAN Ji-zhong¹, ZHANG Hui¹

1. Institute of Traditional Chinese Medicine Research, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

2. Zhejiang Ainuo Biopharmaceutical Co., Ltd., Huzhou 313000, China

Abstract: **Objective** To analyze of quality markers for Buzhong Yiqi products (oral liquid, mixture, water pills, honey pills, concentrated pills) by the HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition. **Methods** Kromasil 100-5-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used as the detection column. The mobile phase was acetonitrile and 0.2% formic acid water with the flow rate of 0.80 mL/min under gradient elution, and the detection wavelength was set at 260 nm. The HPLC fingerprints of 20 batches of Buzhong Yiqi products were established and evaluated for similarity. The common peaks were processed and analyzed by combining hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** There were 16 common peaks in 20 batches of Buzhong Yiqi oral products with similarity of 0.799—0.933. Among these, 10 common peaks were identified. The classification results of HCA, PCA and OPLS-DA showed that 20 batches of Buzhong Yiqi products could be clustered into four categories, Buzhong Yiqi concentrated pills were clustered into one category, Buzhong Yiqi water pills were clustered into one category, Buzhong Yiqi honey pills were clustered into one category, and

收稿日期: 2022-10-09

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LBY22H280003); 浙江工业大学研究生实践基地建设项目(GZ21231160006); 浙江工业大学研究生实践基地建设项目(GZ21881160011)

作者简介: 金唯唯, 女, 研究生, 主要从事中药质量评价方向的研究。E-mail: 3542374924@qq.com

*通信作者: 张慧, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药药效物质基础及质量评价研究。E-mail: zh889@zjut.edu.cn

Buzhong Yiqi mixture and 11 batches oral liquid were clustered into one category. The OPLS-DA results showed that the common peaks with variable importance in projection (VIP) value > 1 were peak 2 (inosine), peak 3 (thymidine), peak 10 (hesperidin), peak 15 (glycyrrhizic acid), and peak 6 (calycosin-7-O- β -D-glucoside). The above five common peaks were selected as the quality markers in Buzhong Yiqi products. **Conclusion** The fingerprint established in this study is simple, accurate and reproducible. It provides a reference for the establishment of the quality evaluation standard system of Buzhong Yiqi products by combining with the chemical pattern recognition analysis.

Key words: Buzhong Yiqi products; HPLC; fingerprint; chemical pattern recognition; quality markers; oral liquid; mixture; water pills; honey pills; concentrated pills; hierarchical cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; glycyrrhizic acid; hesperidin; inosine; thymidine; calycosin-7-O- β -D-glucoside

补中益气方初载于由金元时期著名医家李东垣所著的《内外伤辨惑论》中,组方为(炙)黄芪、(炒)白术、党参、(炙)甘草、陈皮、当归、柴胡、升麻、大枣、生姜,具有补中益气、升阳举陷的功效^[1]。其中黄芪,味甘微温,补脾肺之气,为君药,为立方之本;臣以党参补五内之气,白术健脾燥湿,炙甘草补益脾胃之气,甘温助脾,充运中焦。佐以当归、陈皮理气和胃,养血和营。使以升麻、柴胡升阳举陷,助君药升提下陷之中气^[2]。补中益气方有多种剂型,如补中益气口服液、合剂、丸、颗粒等,其中合剂、丸、颗粒均收录于《中国药典》2020年版中^[1]。研究表明,补中益气产品具有调节胃肠、增强免疫、抗炎、抗疲劳^[3-6]等药理作用;对于消化系统、呼吸系统、泌尿系统、妇科等方面疾病均有一定疗效^[7]。补中益气产品由 10 味中药材制得,成分复杂,采用指纹图谱能够全面且直观地反映复方制剂内部活性成分信息^[8-9]。结合化学模式识别技术可对 HPLC、UPLC-Q-TOF/MS 等多种现代仪器分析获取的数据进行客观分析,将复杂数据中的多维信息进行成分整合,发现数据间的定性、定量关系,解读数据中蕴藏的意义,发掘复杂数据中存在的隐蔽规律,为样品的全面质量控制提供有力保障^[10-12]。

张永昕等^[13]建立补中益气丸(水丸)的 HPLC 指纹图谱,经方法学考察并对不同批次样品进行相似度评价;马宁^[14]对不同厂家不同剂型的补中益气浓缩丸、水丸、大蜜丸指纹图谱分别进行相应的相似度评价,运用层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)对不同剂型样品分类,基于有效成分含量测定数据对不同剂型样品进行主成分分析(principal component analysis, PCA),得到权重综合得分模型,以此为依据对不同厂家药物进行评价。陈锦富^[15]建立补中益气丸中极性部位的指纹图谱,并对指纹图谱中的主要共有峰进行归属,运用不同聚类分析方法(欧氏距离、夹角余弦、相关系数),

对不同厂家的丸剂样品进行了分类与质量评价。

本研究拟收集不同剂型、批次的 20 批补中益气产品,测定其指纹图谱,结合相似度评价、HCA、PCA 和正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)挖掘出指纹图谱中的主要差异性成分,为后续补中益气产品质量评价体系的建立提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent Technologies 1260 型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;SQP 型十万分之一电子天平,赛多利斯科学仪器有限公司;KQ-250DB 型超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司;Finnpipette F3 型系列手动单道移液器 100~1000 μ L,美国 Thermo 公司;高分辨质谱系统:Acquity 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)、AB Sciex Triple TOF 5600+质谱仪(美国 AB Sciex 公司)。

1.2 试剂

对照品肌苷(批号 PS0104,质量分数 99.62%)、芹糖甘草苷(批号 PS011457,质量分数 98.34%)、胸苷(批号 PS020196,质量分数 99.29%)、毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷(批号 PS011743,质量分数 $\geq$ 92.60%)、甘草苷(批号 PS011508,质量分数 $\geq$ 97.90%)、橙皮苷(批号 PS011595,质量分数 $\geq$ 97.90%)、甘草酸铵(批号 PS011619,质量分数 $\geq$ 93.30%)、毛蕊异黄酮(批号 PS13081501,质量分数 99.00%)来自于成都普思生物科技股份有限公司;对照品芒柄花苷(批号 AF8060407,质量分数 98.00%)购自成都埃法生物科技有限公司;对照品芸香柚皮苷(批号 DST190821-098,质量分数 $\geq$ 98.00%)购自成都德思特生物技术有限公司。色谱纯乙腈(批号 21055011)购自美国天地有限公司;分析纯甲酸(批号 20190306)购自广东光华科技股份有限公司;色谱纯甲醇(批号 672840-06001)购

自天津市四友精细化学品有限公司；纯净水购自杭州娃哈哈有限公司。

20 批补中益气产品来源于自购或合作企业提供，批次信息见表 1。

表 1 补中益气产品样品信息

Table 1 Sample information of Buzhong Yiqi related products

剂型	编号	批次	剂型	编号	批次
水丸	S1	SW-106401	口服液	S11	KFY-06112502
水丸	S2	SW-106402	口服液	S12	KFY-06112503
水丸	S3	SW-106403	口服液	S13	KFY-06112504
浓缩丸	S4	NSW-14192301	口服液	S14	KFY-06112505
浓缩丸	S5	NSW-14192302	口服液	S15	KFY-06112506
浓缩丸	S6	NSW-14192303	口服液	S16	KFY-06112507
蜜丸	S7	MW-106301	口服液	S17	KFY-06112508
蜜丸	S8	MW-106302	口服液	S18	KFY-06112509
合剂	S9	HJ-106501	口服液	S19	KFY-06112510
口服液	S10	KFY-06112501	口服液	S20	KFY-06112511

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Kromasil 100-5-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；以乙腈-0.2%甲酸水溶液为流动相，洗脱梯度：0~5 min, 3%乙腈；5~17 min, 3%~15%乙腈；17~21 min, 15%乙腈；21~27 min, 15%~21%乙腈；27~31 min, 21%乙腈；31~42 min, 21%~27%乙腈；42~60 min, 27%~45%乙腈；60~70 min, 45%~50%乙腈；70~71 min, 50%~100%乙腈；71~75 min, 100%乙腈；体积流量为 0.80 mL/min；检测波长为 260 nm；柱温为 35 ℃；进样量为 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

取毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷、甘草苷、橙皮苷、甘草酸铵、芸香柚皮苷、肌苷、胸苷、芹糖甘草苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷对照品适量，加甲醇制得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密量取补中益气口服液 1 mL，用甲醇定容至 10 mL，超声 5 min，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一批补中益气口服液 (S14)，按“2.3”项下方法制备 1 份供试品溶液，在“2.1”项下色谱条件、连续进样 6 次，以 10 号

橙皮苷色谱峰为参照峰 (S)，计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 均<1.86%，相对峰面积的 RSD 均<4.75%，表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批补中益气口服液 (S14)，按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，以 10 号峰橙皮苷色谱峰为参照峰 (S)，计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 均<1.29%，相对峰面积的 RSD 均<4.32%，表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一批补中益气口服液 (S14)，按“2.3”项下方法制备 1 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，以 10 号橙皮苷色谱峰为参照峰 (S)，计算得到各共有峰相对保留时间的 RSD 均<0.53%，相对峰面积的 RSD 均<2.90%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 HPLC-QTOF-MS/MS 分析结果

采用 AB Sciex Triple TOF 5600+质谱仪，ESI 正、负离子模式下对供试品溶液进行检测。一级质谱扫描范围为 m/z 100~1500，二级质谱扫描范围 m/z 50~1500；负离子模式，雾化气 (GS1) 379.212 kPa (55 psi)；气帘气 (CUR) 241.317 kPa (35 psi)；离子源温度 (TEM) 550 ℃；离子源电压 (IS) -4500 V；一级扫描去簇电压 -80 V；碰撞能量 -5 V。正离子模式，雾化气 (GS1) 379.212 kPa (55 psi)；气帘气 (CUR) 241.317 kPa (35 psi)；离子源温度 (TEM) 600 ℃；离子源电压 (IS) +5500 V；一级扫描去簇电压 +80 V；碰撞能量 +5 V。实验数据采用 Peakview 软件 (AB Sciex, version 1.2.0.3) 进行分析。

按“2.1”项下色谱条件，采用 HPLC-QTOF-MS/MS 技术对补中益气口服液样品进样分析，正、负总离子流图见图 1。根据化合物准确相对分子质量、各化合物的碎片信息，共推测了 97 个化合物，其中黄酮类化合物有 50 个，三萜皂苷类化合物有 12 个，有机酸类化合物有 15 个，核苷类成分 4 个，苯丙苷类成分 3 个，柠檬苦素类成分 3 个，香豆素类成分 2 个，芳香糖苷、氨基酸、紫檀素、炔苷、类黄酮、黄烷、倍半萜类化学成分各 1 个，其他类成分 1 个。具体结果见表 2。

2.6 指纹图谱的建立及相似度评价

2.6.1 供试品溶液制备 取 20 批补中益气产品，其中水丸 (0.60 g)、浓缩丸 (0.60 g) 粉碎；口服液与

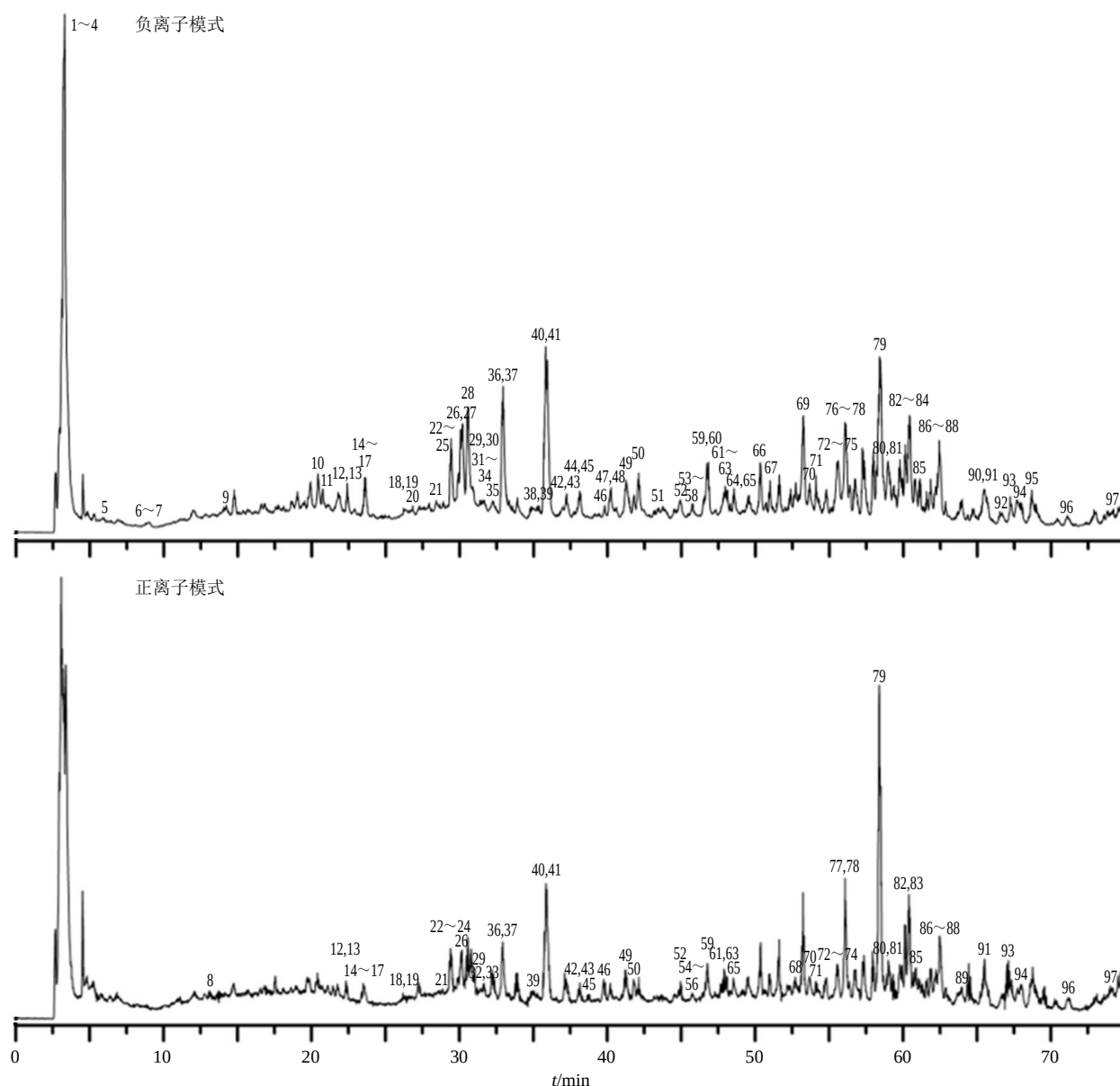


图 1 补中益气口服液 HPLC-QTOF-MSMS 的总离子流图

Fig. 1 TIC chromatograms of Buzhong Yiqi Oral Liquid based on HPLC-QTOF-MSMS

合剂取 1.00 mL，蜜丸（蜂蜜为黏合剂所制成的可塑性固体丸剂，可直接取用）取 1.20 g；将以上样品用甲醇定容至 10 mL；超声 5 min，经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得 20 份供试品溶液。

2.6.2 指纹图谱测定 按“2.1”项下色谱条件进样测定 20 份供试品溶液色谱图，将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”，以 S14 号样品色谱图作为参照图谱，进行色谱峰匹配，建立补中益气产品叠加色谱图，以平均数法生成方法，时间窗宽度设为 0.1 min，确定 16 个共有峰，叠加色谱图见图 2。

基于“2.5”项下分析结果对指纹图谱中的 16

个共有峰进行化学成分析，结合混合对照品色谱图共指认了 10 个成分，肌苷（峰 2）、胸苷（峰 3）、毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷（6 号峰）、芹糖甘草苷（7 号峰）、甘草苷（8 号峰）、芸香柚皮苷（9 号峰）、橙皮苷（10 号峰）、芒柄花苷（11 号峰）、毛蕊异黄酮（12 号峰）、甘草酸（15 号峰），色谱图见图 3。

补中益气产品样品（S1~S20）与对照指纹图谱（R）的相似度分别为 0.933、0.881、0.911、0.799、0.843、0.881、0.885、0.917、0.913、0.918、0.871、0.875、0.929、0.919、0.875、0.870、0.868、0.912、0.931、0.913，均在 0.799~0.933。其中水丸（S1~S3）、蜜丸（S7~S8）、合剂（S9）所得相似

表 2 补中益气口服液中的化学成分信息

Table 2 Chemical constituents from Buzhong Yiqi Oral Liquid

序号	<i>t</i> /min	分子式	离子模式	<i>m/z</i> 实测值	误差($\times 10^{-6}$)	碎片离子	名称	归属	类别
1	3.01	C ₆ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	195.051 9	4.5	129.019 7, 75.010 9, 59.017 7	葡萄糖 ^[16]	当归、黄芪	有机酸
2	3.22	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	191.056 6	2.6	171.030 4, 127.041 7, 109.031 9, 93.035 9	奎尼酸 ^[17]	未知	有机酸
3	3.58	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	191.020 6	4.6	173.008 6, 111.007 9, 87.007 8, 85.028 5	柠檬酸 ^[16,18]	当归、黄芪	有机酸
4	3.70	C ₇ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	203.020 2	2.3	141.020 0, 97.031 1, 79.021 1	daucic acid ^[16]	当归	有机酸
5	5.92	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	[M-H] ⁻	243.062 5	1.0	152.034 0, 200.055 8	尿苷 ^[18-19]	甘草	核苷
6	8.97	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	[M-H] ⁻	282.084 3	-0.3	150.042 8, 133.016 2	鸟苷 ^[18]	黄芪	核苷
7	9.29	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	[M-H] ⁻	267.073 5	-3.3	135.030 9	肌苷 ^[16]	黄芪	核苷
8	12.78	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	[M+H] ⁺	243.097 6	-3.5	127.050 8, 110.024 4, 84.043 6	胸苷 ^[20]	黄芪	核苷
9	13.35	C ₉ H ₁₇ NO ₅	[M-H] ⁻	218.103 9	2.3	146.081 7, 88.041 6, 71.052 3	<i>D</i> -泛酸 ^[21]	未知	有机酸
10	20.44	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.087 0	-2.3	191.055 8, 179.034 1, 161.023 7	绿原酸 ^[22]	党参、陈皮	有机酸
11	21.08	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	401.144 6	-1.8	269.104 1, 193.051 6, 161.046 9	淫羊藿次苷 F ₂ ^[23]	白术	芳香糖苷
12	22.42	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.149 6	-3.2	473.108 2, 353.066 6, 383.076 9	维采宁-2 ^[19,22,24]	甘草	黄酮
			[M+H] ⁺	595.165 8	-4.1	379.081 7, 457.111 0			
13	22.42	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺	593.149 5	-2.9	353.066 8, 297.077 4	山奈酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷 ^[24]	黄芪、陈皮	黄酮
			[M-H] ⁻	595.165 8	-4.1	449.106 6, 287.054 8			
14	23.63	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	433.112 5	-3.5	151.002 7, 271.061 2	黄杞苷 ^[19]	黄芪、甘草	黄酮
			[M+H] ⁺	435.128 6	-3.2	153.078 8, 273.075 5			
15	23.63	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₉	[M-H] ⁻	741.223 0	-2.4	579.170 1, 271.060 5, 151.003 7	柚皮苷 4'-葡萄糖苷 ^[25]	陈皮	黄酮
			[M+H] ⁺	743.239 3	-2.7	407.115 6, 273.076 7, 153.018 3			
16	24.16	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	449.107 1	-3.9	287.044 9, 269.024 5	圣草酚-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[25]	陈皮	黄酮
			[M+H] ⁺	451.123 5	1.6	323.076 3, 179.035 2, 161.025 4			
17	24.16	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	449.106 9	-4.0	125.022 7, 259.060 7	槲皮素-7- <i>O</i> -鼠李糖苷 ^[26]	甘草	黄酮
			[M+H] ⁺	451.123 5	-2.5	302.565 7, 166.120 5			
18	26.36	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.138 2	-4.3	473.111 1, 353.066 5, 117.032 9	夏佛塔苷 ^[19]	甘草	黄酮
			[M+H] ⁺	565.155 2	-4.6	295.059 5, 379.079 0			
19	26.36	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	563.138 3	-4.1	353.066 0, 297.076 3	芹菜苷 ^[19]	甘草	黄酮
			[M+H] ⁺	565.155 2	-4.6	271.059 8, 153.018 2			
20	27.38	C ₂₉ H ₄₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	677.226 4	-4.5	497.200 0, 453.200 0, 261.100 0	党参苷 I ^[27]	党参	苯丙苷
21	27.94	C ₃₄ H ₄₄ O ₂₀	[M-H] ⁻	771.233 2	-2.7	301.071 9	hesperidin monoglucose ^[28]	陈皮	黄酮
			[M+H] ⁺	773.249 9	-3.8	447.126 8, 369.095 6, 303.085 4			
22	29.40	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	[M-H] ⁻	595.164 8	-3.4	475.110 2, 287.054 7, 271.060 8	析圣草枸橼苷 ^[25]	黄芪、陈皮	黄酮
			[M+H] ⁺	597.181 4	-3.2	435.124 3, 289.073 1, 273.057 6			
23	29.41	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	577.154 1	-3.8	457.087 2, 383.046 0	佛菜心苷 ^[19]	甘草	黄酮
			[M+H] ⁺	579.170 8	-4.5	283.059 9			
24	29.43	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M+HCOO] ⁻	491.117 7	-4.1	283.061 7, 268.038 5	毛蕊异黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[18,22]	黄芪	黄酮
			[M+H] ⁺	447.128 6	-3.7	285.074 8, 270.051 4, 125.986 2			
25	29.75	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₂	[M-H] ⁻	469.134 0	-3.5	325.093 3, 163.039 1, 119.049 0	党参苷 VI ^[27]	党参	苯丙苷
26	30.07	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	609.144 3	-3.3	135.007 2, 285.076 5	芦丁 ^[18-19,24]	柴胡、大枣、甘草、黄芪	黄酮
			[M+H] ⁺	611.160 7	-3.9	137.023 3, 257.080 6			
27	30.14	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	[M-H] ⁻	549.150 4	-3.6	417.118 4, 255.065 9, 135.007 5	芹糖甘草苷 ^[19]	甘草	黄酮
28	30.56	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.118 1	-2.4	255.066 2, 135.007 4, 119.048 8	甘草苷 ^[19]	甘草	黄酮
29	30.73	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.051 1	-2.4	178.027 6, 149.061 2, 134.037 4	阿魏酸 ^[24]	当归、升麻	有机酸
			[M+H] ⁺	195.065 2	-4.0	177.054 5, 163.038 8, 145.028 3			

续表 2

序号	<i>t</i> /min	分子式	离子模式	<i>m/z</i> 实测值	误差($\times 10^{-6}$)	碎片离子	名称	归属	类别
30	30.84	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	623.197 1	-0.9	623.200 4, 461.170 3, 315.111 7, 161.026 4	毛蕊花糖苷 ^[22]	黄芪	苯丙苷
31	31.32	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	463.087 3	-1.9	301.035 2, 271.024 6	异槲皮苷 ^[18-19]	柴胡、甘草、黄芪	黄酮
32	31.63	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	461.107 2	-3.8	377.077 4, 241.046 2, 149.026 7	香叶木素-7-O-β-D-葡萄糖苷 ^[29]	陈皮	黄酮
			[M+H] ⁺	463.123 5	-3.0	286.300 0, 258.300 0, 229.200 0, 153.000 0			
33	31.64	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	461.107 7	-2.7	299.056 8, 284.032 8, 283.023 4	红车轴草素-7-O-β-D-葡萄糖苷 ^[18]	黄芪	黄酮
			[M+H] ⁺	463.123 5	-3.0	301.070 8, 286.047 7, 241.048 5			
34	31.73	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M-H] ⁻	245.093 7	2.2	203.083 2, 159.089 5, 142.065 4, 116.049 6, 98.024 9, 74.026 1	<i>N</i> -乙酰-DL-色氨酸 ^[21]	未知	氨基酸
35	32.09	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.051 2	2.9	178.028 0, 149.059 7, 134.037 5	异阿魏酸 ^[16]	黄芪、当归、升麻	有机酸
36	32.85	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	271.060 8	-1.5	151.002 0, 119.048 3, 107.013 1, 83.011 7	柚皮素 ^[19,24-25]	陈皮、甘草	黄酮
			[M-H] ⁻	273.075 8	-2.4	153.018 2, 147.044 0, 137.023 3			
37	32.93	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	579.169 9	-3.5	151.004 6, 271.061 0, 459.116 3	芸香柚皮苷 ^[25]	陈皮	黄酮
			[M+H] ⁺	581.186 5	-4.1	273.076 1, 195.028 5, 153.017 9			
38	35.41	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.091 8	-3.3	447.096 4, 300.030 6, 255.032 6, 151.005 6	紫云英苷 ^[19,22]	甘草、陈皮	黄酮
39	35.53	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	[M-H] ⁻	607.165 8	-1.7	299.056 1, 284.032 6	新地奥明 ^[25]	陈皮	黄酮
			[M+H] ⁺	609.181 4	-4.1	301.070 2, 301.519 3, 286.046 0			
40	35.87	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	[M-H] ⁻	609.181 7	-1.1	609.185 9, 447.095 0, 325.074 5	橙皮苷 ^[22,24-25]	陈皮	黄酮
			[M+H] ⁺	611.197 0	-4.0	303.085 5, 263.054 3, 153.017 4			
41	35.87	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	[M-H] ⁻	609.181 7	-1.1	609.185 9, 447.095 0, 325.074 5	新橙皮苷 ^[25]	陈皮	黄酮
			[M+H] ⁺	611.197 0	-4.0	303.085 5, 263.054 3, 153.017 4			
42	37.70	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	515.118 7	-1.6	173.043 1, 353.095 4, 515.118 5	异绿原酸 B ^[30-31]	黄芪、柴胡	有机酸
			[M+H] ⁺	517.134 0	-2.0	539.124 4, 517.121 3, 355.101 9			
43	37.79	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M-H] ⁻	515.118 7	-1.6	191.055 3, 353.087 6, 515.109 1	异绿原酸 A ^[30-31]	黄芪、柴胡	有机酸
			[M+H] ⁺	517.134 0	-2.0	539.124 4, 499.109 9, 355.101 9			
44	38.02	C ₂₀ H ₂₈ O ₈	[M-H] ⁻	395.171 1	-3.1	233.117 7, 215.106 9	党参炔苷 ^[27]	党参	炔苷
45	38.17	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₇	[M-H] ⁻	651.156 4	-0.4	507.112 9, 345.061 1, 287.019 3	obacunoic acid-17-β-D-glucoside ^[28]	当归	有机酸
			[M+H] ⁺	653.171 2	-3.7	347.073 7, 127.037 8, 103.038 8			
46	39.26	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₁	[M-H] ⁻	463.123 7	-1.9	286.023 9, 151.078 8	hesperitin-7-O-β-D-glucoside ^[28]	陈皮	黄酮
			[M+H] ⁺	465.139 1	-4.8	303.086 8, 177.054 5, 153.018 4			
47	40.16	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	693.276 0	-0.6	565.264 7	nomilin glycoside ^[28]	陈皮	柠檬苦素
48	40.63	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₆	[M-H] ⁻	711.286 2	-1.1	651.266 5, 607.276 5, 401.230 4, 275.164 3, 161.046 1	nomilinic acid-17-β-D-glucoside ^[28]	陈皮	柠檬苦素
49	41.29	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	[M+HCOO] ⁻	475.123 6	-2.1	267.066 4, 252.043 7	芒柄花苷 ^[18-19]	甘草、黄芪	黄酮
			[M+H] ⁺	431.133 7	-3.4	269.080 6, 254.057 1			
50	42.24	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	445.076 5	-2.6	269.044 4, 175.026 6	黄芩苷 ^[32]	柴胡	黄酮
			[M+H] ⁺	447.092 2	-3.6	447.091 2, 271.060 1, 169.017 6			
51	43.19	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₃	[M-H] ⁻	633.255 1	-0.3	589.266 5, 427.212 4, 359.187 4, 331.191 2, 101.027 0	obacunone glycoside ^[28]	陈皮	柠檬苦素
52	44.92	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	253.050 6	-0.1	224.057 5, 209.058 7, 208.061 3, 133.032 5	大豆苷元 ^[18]	黄芪	黄酮
			[M+H] ⁺	255.065 2	-3.5	237.053 7, 227.063 5, 199.075 6, 137.023 4, 128.064 1			
53	46.55	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255.067 0	2.8	135.009 2, 119.050 7, 93.036 0, 91.020 6	异甘草素 ^[19]	柴胡、甘草	黄酮
54	46.55	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255.067 0	-2.8	119.048 6, 135.007 2, 153.018 2	乔松素 ^[19]	甘草、柴胡	黄酮
			[M+H] ⁺	257.080 8	-2.9	137.023 3, 147.044 0, 119.049 3			
55	46.67	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	[M-H] ⁻	463.159 4	-3.4	301.107 3, 286.084 0, 164.047 5, 149.025 0, 121.030 0, 109.031 3	黄芪异黄酮苷 ^[18]	黄芪	类黄酮
			[M+H] ⁺	465.175 5	-4.6	429.158 9, 189.053 2, 181.084 1, 167.069 6, 147.044 8, 123.043 8			
56	46.73	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.040 2	-0.9	229.050 5, 211.039 3, 185.060 1	山柰酚 ^[24]	柴胡、甘草、大枣、	黄酮
			[M+H] ⁺	287.055 0	-1.1	258.051 2, 165.018 3, 153.018 1		黄芪、陈皮	

续表 2

序号	<i>t</i> /min	分子式	离子模式	<i>m/z</i> 实测值	误差($\times 10^{-6}$)	碎片离子	名称	归属	类别
57	46.73	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.040 0	-1.6	285.039 4, 257.045 1, 241.050 8, 217.050 2, 199.039 8, 151.003 0, 133.031 0	木犀草素 ^[22]	党参、陈皮	黄酮
58	46.79	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	[M-H] ⁻	593.186 7	-1.5	327.089 1, 285.079 3, 241.087 8, 164.013 5	香蜂草苷 ^[22]	陈皮	黄酮
59	47.20	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	299.056 1	0.0	284.033 5, 188.049 9, 183.046 1, 165.026 2	红车轴草素 ^[18]	黄芪	黄酮
			[M+H] ⁺	301.070 7	-2.9	286.047 2, 153.018 3, 134.036 5			
60	47.20	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	299.056 3	0.6	284.032 2, 256.036 8	金圣草(黄)素 ^[18]	陈皮	黄酮
61	47.95	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	283.061 7	-1.8	268.038 4, 195.045 7, 184.053 6, 167.051 2, 135.009 2	毛蕊异黄酮 ^[19,22]	黄芪、甘草	黄酮
			[M+H] ⁺	285.075 8	-1.9	270.052 0, 137.023 3, 225.054 6			
62	47.95	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	283.061 7	1.8	283.063 5, 239.037 0, 211.041 5, 135.010 0	汉黄芩素 ^[22]	黄芪	黄酮
63	47.95	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	283.061 7	-1.8	148.015 3, 268.037 4	樱黄素 ^[19]	甘草	黄酮
			[M+H] ⁺	285.075 8	-1.9	147.039 6, 229.085 3			
64	48.52	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₂	[M-H] ⁻	999.445 2	1.0	837.389 9, 351.057 3, 835.374 0, 825.423 9	24-羟基-甘草皂苷 A3 ^[33]	甘草	三萜皂苷
65	48.78	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.035 2	-0.6	124.015 0, 139.038 5, 151.002 9, 178.996 0	槲皮素 ^[19,24]	柴胡、大枣、	黄酮
			[M+H] ⁺	303.049 9	-2.7	285.038 5, 229.049 3, 153.018 1, 137.023 4		甘草、黄芪	
66	50.46	C ₂₀ H ₃₆ O ₇	[M-H] ⁻	389.253 3	-0.2	371.244 1, 330.204 9, 311.211 5, 284.200 7, 244.169 5	teradecylcitric acid ^[35]	白术	有机酸
67	50.98	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	[M-H] ⁻	983.450 3	1.0	821.396 0, 351.057 4, 193.035 0	甘草皂苷 A3 ^[34]	甘草	三萜皂苷
68	51.62	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₈	[M+H] ⁺	725.228 7	-3.9	419.133 0, 404.109 6, 389.086 1	melitidin ^[28]	陈皮	黄酮
69	53.11	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	879.402 9	1.0	351.057 1, 193.035 1	22-β-乙酰基-甘草素 ^[35]	甘草	黄酮
70	53.83	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	[M-H] ⁻	269.082 1	-0.6	268.037 6, 147.015 3	刺甘草查耳酮 ^[19]	甘草	黄酮
			[M+H] ⁺	271.096 5	-2.9	177.059 7, 229.101 9			
71	54.10	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 6	-0.2	241.049 9, 225.055 4, 197.059 9	芹菜素 ^[19,21]	甘草	黄酮
			[M+H] ⁺	271.060 1	-1.5	153.018 1, 197.060 0			
72	55.51	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	[M+HCOO] ⁻	829.458 6	-0.6	783.458 6, 179.054 8, 651.421 0, 621.412 0, 489.358 0	黄芪甲苷 ^[18]	黄芪	三萜皂苷
			[M+H] ⁺	785.468 18	-4.2	767.441 9, 473.363 7, 455.352 5, 297.222 6, 143.106 7, 125.096 6			
73	55.59	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	301.071 5	-0.5	301.074 3, 285.041 9, 164.013 5	橙皮素 ^[22,24]	陈皮	黄酮
			[M+H] ⁺	303.086 3	-3.3	136.018 5, 285.075 8, 177.054 6, 163.038 9, 153.018 2			
74	56.00	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	315.051 9	-2.8	300.027 3, 271.024 9, 152.010 2	异鼠李素 ^[24]	柴胡、甘草、	黄酮
			[M+H] ⁺	317.065 6	-2.1	302.041 9, 285.039 0, 274.046 6, 153.018 2		黄芪、陈皮	
75	56.10	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	[M-H] ⁻	837.392 5	1.3	351.056 7, 193.035 5, 661.357 1, 485.325 6	licoricesaponin G2 ^[35]	甘草	三萜皂苷
76	56.79	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	[M+HCOO] ⁻	971.521 9	-0.2	925.517 0, 779.459 2, 617.405 6	柴胡皂苷 I ^[36]	柴胡	三萜皂苷
77	56.79	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	[M+HCOO] ⁻	971.521 9	-0.2	925.517 0, 779.459 2, 617.405 7	柴胡皂苷 C ^[17,32]	柴胡	三萜皂苷
			[M+H] ⁺	927.531 2	-2.5	909.522 3, 763.458 7, 745.428 8, 601.390 6, 421.333 2			
78	56.89	C ₂₆ H ₃₄ O ₉	[M-H] ⁻	489.211 4	-3.3	471.201 6, 357.180 5, 333.133 8, 261.102 5, 111.046 7	sudachinoid A ^[28]	陈皮	其他
			[M+H] ⁺	491.227 6	-3.8	473.216 7, 281.153 1, 243.101 6, 187.074 4, 161.058 7			
79	58.42	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	821.397 4	1.1	803.390 1, 759.396 5, 469.331 6, 351.056 2	甘草酸 ^[26]	甘草、升麻	有机酸
			[M+Na] ⁺	845.393 0	-4.9	669.363 1, 493.331 0, 375.055 0			
80	58.99	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	[M+HCOO] ⁻	871.470 6	1.1	825.461 6, 783.452 9, 765.440 7, 651.426 5, 489.354 6	黄芪皂苷 II ^[18]	黄芪	三萜皂苷
			[M+H] ⁺	827.478 8	-3.9	647.413 3, 175.060 3, 157.048 0, 143.106 9, 125.096 6			
81	59.36	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	267.067 0	2.7	167.051 0, 132.021 7, 104.026 5	刺芒柄花素 ^[19,22]	甘草、黄芪	黄酮
			[M+H] ⁺	269.080 8	-0.9	213.090 8, 118.041 6			
82	60.14	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	779.459 0	0.4	617.403 8, 779.455 4	柴胡皂苷 A ^[17,32]	柴胡	三萜皂苷
			[M+H] ⁺	781.473 3	-2.4	781.472 3, 763.458 7, 601.390 6, 455.337 7, 437.327 9			
83	60.67	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	[M-H] ⁻	299.092 7	0.7	284.070 6, 185.061 3, 171.046 7	黄芪紫檀烷 ^[18]	黄芪	紫檀素
			[M+H] ⁺	301.107 0	-2.8	269.081 7, 134.037 2, 124.052 3, 106.041 8			

续表 2

序号	t/min	分子式	离子模式	m/z 实测值	误差($\times 10^{-6}$)	碎片离子	名称	归属	类别
84	60.84	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	313.071 7	-0.2	298.049 0, 283.026 1, 255.031 1, 227.035 4, 183.045 5, 135.006 5, 117.039 6	柳穿鱼黄素 ^[37]	陈皮	黄酮
85	61.66	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	[M-H] ⁻	301.107 8	-1.2	286.083 1, 164.044 9, 149.024 2, 109.026 8	异微凸剑叶莎醇 ^[28]	黄芪	黄烷
			[M+H] ⁺	303.122 7	-4.3	303.123 4, 167.070 3, 161.058 9, 133.064 5, 123.044 2			
86	62.49	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	779.459 1	0.5	617.403 8, 779.455 4	柴胡皂苷 D ^[31]	柴胡	三萜皂苷
			[M+H] ⁺	781.473 3	-2.0	803.456 3, 765.997 0, 603.399 5, 457.340 3			
87	62.66	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	531.222 8	-1.5	489.209 6, 471.199 3, 307.169 3, 273.151 5	nomilinic acid ^[25]	陈皮	有机酸
			[M+H] ⁺	533.238 1	-4.9	341.211 8, 215.106 5, 187.076 0, 161.059 5			
88	62.93	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	[M-H] ⁻	233.155 4	3.0	160.891 7, 233.154 0	青蒿酸 ^[19]	甘草	有机酸
			[M+H] ⁺	235.169 3	-4.2	116.070 7, 189.102 4			
89	64.44	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	[M+H] ⁺	403.138 0	-1.8	388.114 7, 373.091 2, 327.085 7, 211.023 3, 183.028 6	川陈皮素 ^[22,24-25]	陈皮	黄酮
90	65.27	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	821.468 0	-1.6	127.038 3, 617.405 6, 779.461 9	4"-O-乙酰基柴胡皂苷 D ^[39]	柴胡	三萜皂苷
91	66.43	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M-H] ⁻	285.077 0	0.5	270.055 2, 243.065 9, 175.081 7, 164.012 2	氧化前胡素 ^[24]	陈皮	香豆素
			[M+H] ⁺	287.091 4	-2.4	163.018 4, 161.059 5, 133.064 9, 126.971 6			
92	66.59	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₂	[M+HCOO] ⁻	809.469 4	0.1	101.026 5, 601.408 8, 763.476 9	柴胡皂苷 M ^[34]	柴胡	三萜皂苷
93	67.29	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	[M-H] ⁻	367.118 7	0.0	309.041 1, 255.029 9	甘草香豆素 ^[19]	甘草	香豆素
			[M+H] ⁺	369.133 3	-2.3	313.071 0, 179.034 1, 123.042 2			
94	68.62	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	[M-H] ⁻	247.134 4	-1.7	247.135 6	白术内酯 III ^[27,38]	白术、党参	倍半萜
			[M+H] ⁺	249.148 5	-2.1	231.137 7, 203.142 9			
95	68.79	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	[M+HCOO] ⁻	823.483 8	-0.2	116.928 6, 351.056 8, 471.347 8, 617.405 7, 761.448 8, 779.459 5	6"-O-乙酰基柴胡皂苷 D ^[17]	柴胡	三萜皂苷
96	71.66	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	[M-H] ⁻	339.123 9	0.3	183.011 4, 197.026 9	鳞叶甘草素 B ^[19]	甘草	黄酮
			[M+H] ⁺	341.138 4	-4.3	223.070 2, 105.033 9			
97	74.14	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	[M-H] ⁻	337.108 0	-0.4	281.044 9, 253.049 8	鳞叶甘草素 A ^[19]	甘草	黄酮
			[M+H] ⁺	339.122 7	-2.1	123.044 2, 189.097 7, 311.127 1			

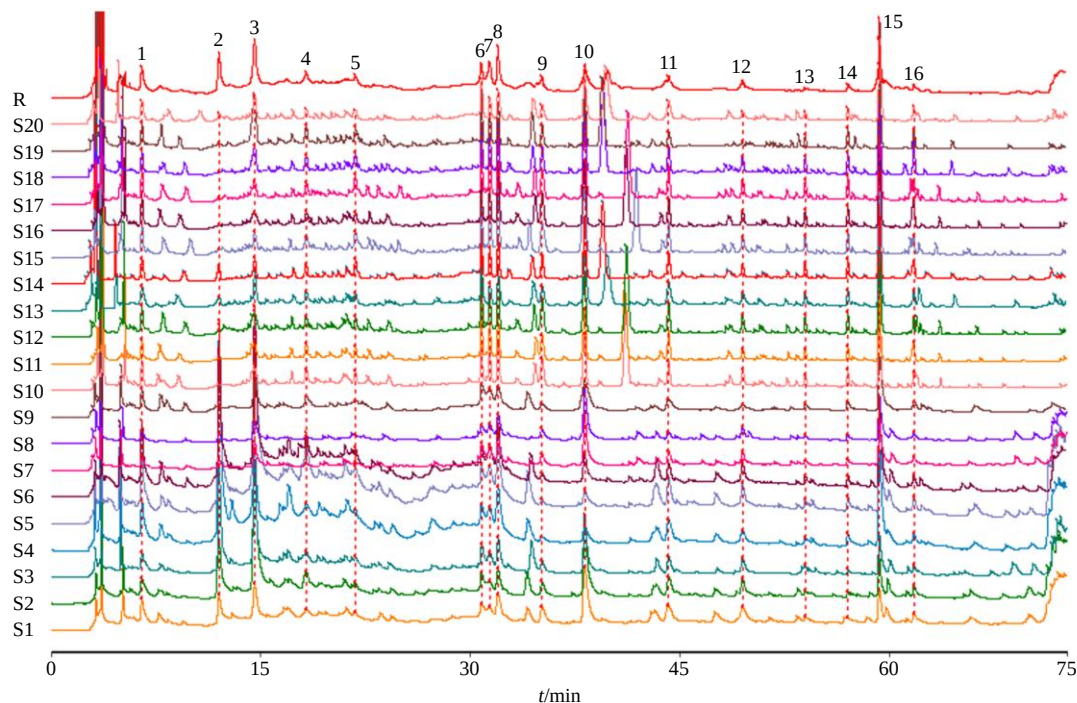
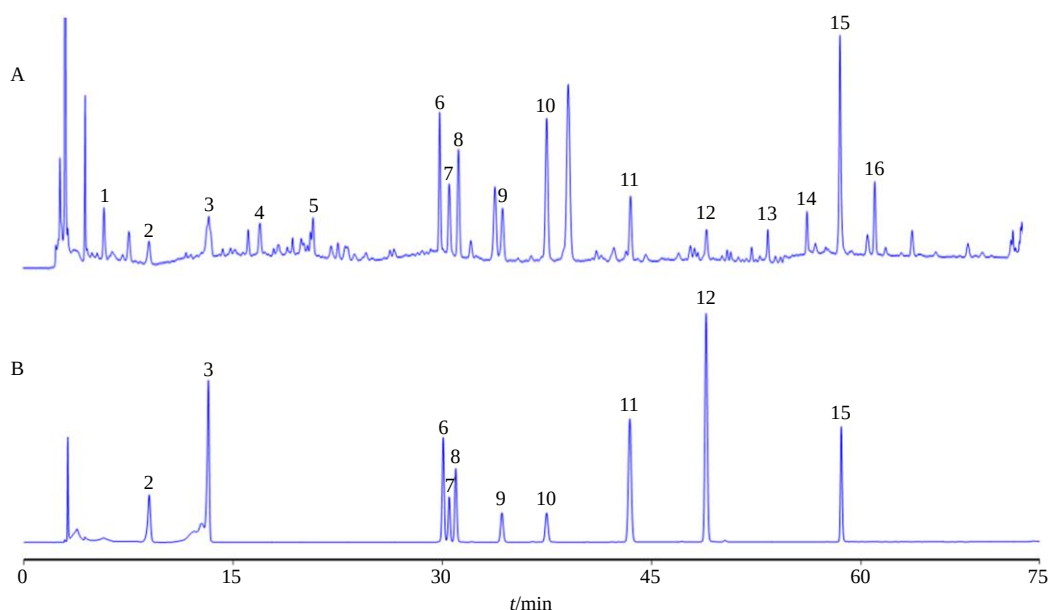


图 2 20 批补中益气产品的 HPLC 指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

Fig. 2 HPLC fingerprints and control fingerprint (R) of 20 batches of Buzhong Yiqi products



2-肌苷(黄芪) 3-胸苷(黄芪) 6-毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷(黄芪) 7-芹糖甘草苷(甘草) 8-甘草苷(甘草) 9-芸香柚皮苷(陈皮)
10-橙皮苷(陈皮) 11-芒柄花苷(黄芪、甘草) 12-毛蕊异黄酮(黄芪、甘草) 15-甘草酸(甘草)
2-inosine (*Astragali Radix*) 3-thymidine (*Astragali Radix*) 6-calycosin-7-O- β -D-glucoside (*Astragali Radix*) 7-liquiritin apioside (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*) 8-liquiritin (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*) 9-narirutin (*Citri Reticulatae Pericarpium*) 10-hesperidin (*Citri Reticulatae Pericarpium*) 11-ononin (*Astragali Radix, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*) 12-calycosin (*Astragali Radix, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*) 15-glycyrrhizic acid (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*)

图 3 补中益气产品样品 (S14, A)、混合对照品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of Buzhong Yiqi products (S14, A) and mixed reference substances (B)

度整体高于浓缩丸 (S4~S6); 说明浓缩丸与其他剂型化学成分整体特征具有一定差异性。以此为基础选取 16 个共有峰的峰面积进行 HCA、PCA 和 OPLS-DA, 对不同批次样品进行分类, 找出对整体指纹图谱影响较大的成分色谱峰。

2.7 化学模式识别分析

2.7.1 HCA 以 20 批补中益气产品的 260 nm 下 HPLC 指纹图谱的 16 个共有峰峰面积为变量, 导入 SIMCA 13.0 软件, 进行 HCA, 结果见图 4。距离为 20 时, 可将样品大体分为 4 类。一类是样品 S1~S3; 一类是样品 S4~S6; 一类是样品 S7、S8; 一类是样品 S9~S20; 具体样品分类见表 3, 由分类情况可见, 不同剂型补中益气产品分类较为明确。

2.7.2 PCA PCA 是一种将多个指标化为少数几个综合指标的一种统计方法, 用少数几个综合指标来反映大量原始指标的主要信息, 从而使问题简化^[40]。以 20 批补中益气产品的 260 nm 下 HPLC 指纹图谱的 16 个共有峰峰面积为变量, 导入 SPSS 19.0 软件, 进行 PCA。以特征值>1 为抽取标准, 主成分的特征值及方差贡献率(表 4)与碎石图(图 5)结合可得到前 4 个主成分的累积方差贡献率为 85.721%,

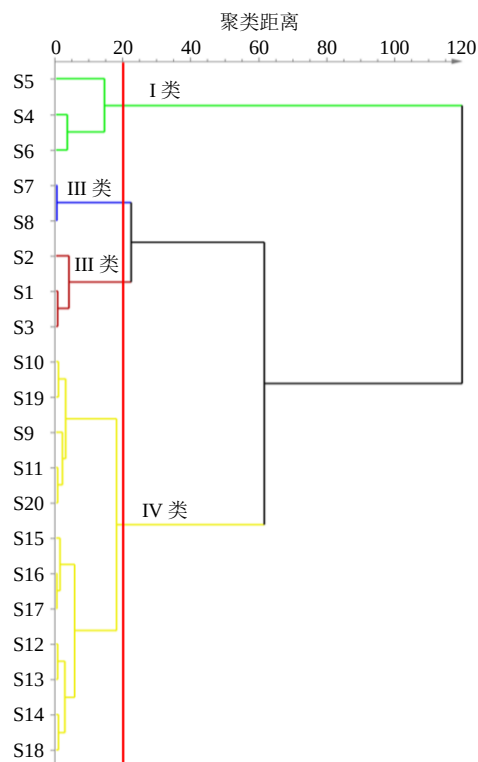


图 4 20 批补中益气产品聚类分析树状图

Fig. 4 Tree diagram of cluster analysis for 20 batches of Buzhong Yiqi products

表 3 HCA 分类情况

Table 3 Classification of HCA

分类	编号	剂型	批次
第一类	S1~S3	水丸	SW-106401、SW-106402、SW-106403
第二类	S4~S6	浓缩丸	NSW-14192301、NSW-14192302、NSW-14192303
第三类	S7、S8	蜜丸	MW-106301、MW-106302
第四类	S9~S20	口服液、 合剂	KFY-06112501、KFY-06112502、KFY-06112503、KFY-06112504、KFY-06112505、KFY-06112506、 KFY-06112507、KFY-06112508、KFY-06112509、KFY-06112510、KFY-06112511、HJ-106501

表 4 样品主成分特征值及累积方差贡献率

Table 4 Eigenvalues of principal components of samples and cumulative variance contribution rate

主成分	初始特征值			提取特征值		
	合计	方差贡 献率/%	累积贡 献率/%	合计	方差贡 献率/%	累积贡 献率/%
1	6.963	43.516	43.516	6.963	43.516	43.516
2	3.772	23.573	67.089	3.772	23.573	67.089
3	1.980	12.378	79.467	1.980	12.378	79.467
4	1.001	6.254	85.721	1.001	6.254	85.721
5	0.727	4.546	90.268			
6	0.463	2.896	93.163			
7	0.319	1.992	95.155			
8	0.235	1.466	96.621			
9	0.174	1.086	97.708			
10	0.138	0.865	98.573			
11	0.087	0.542	99.115			
12	0.051	0.321	99.436			
13	0.042	0.262	99.698			
14	0.025	0.154	99.852			
15	0.016	0.102	99.954			
16	0.007	0.046	100.000			

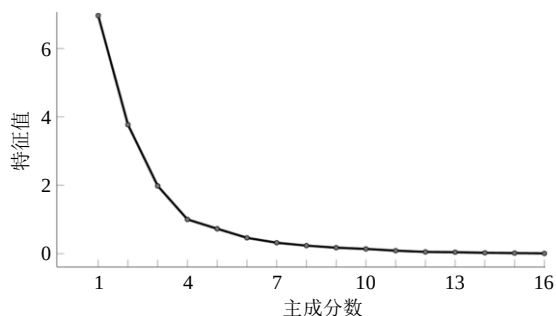


图 5 碎石图

Fig. 5 Gravel diagram

大于 80%，说明前 4 个主成分可以解释 20 批补中益气产品指纹图谱共有峰的绝大部分信息，因此，可以用 4 个主成分来评价补中益气产品。

由表 5 因子载荷矩阵可知，第 1 主成分的信息主要来自于峰 1~5、8、11、12、14、15，且与之成正相关；第 2 主成分的影响因素主要来自峰 6、7、14、16，且与之成正相关；第 3 主成分的影响因素主要来自峰 9、10、13，且与之成正相关；第 4 主成分的影响因素主要来自峰 11，且与之成正相关。

表 5 补中益气产品主成分因子载荷矩阵

Table 5 Principal component factor load matrix of Buzhong Yiqi products

峰号	载荷			
	1	2	3	4
1	0.876	-0.081	0.176	-0.271
2	0.920	-0.279	0.003	0.020
3	0.797	-0.367	0.178	-0.096
4	0.870	-0.007	-0.277	0.220
5	0.877	-0.062	-0.135	0.290
6	-0.299	0.706	-0.127	0.473
7	0.041	0.884	0.074	-0.321
8	0.853	0.237	0.336	-0.022
9	-0.628	0.434	0.509	0.196
10	-0.441	-0.582	0.554	0.125
11	0.636	0.338	0.253	0.530
12	0.697	-0.471	0.470	0.005
13	0.130	0.426	0.827	-0.033
14	0.603	0.659	-0.252	0.056
15	0.715	0.459	-0.205	-0.236
16	0.003	0.722	0.222	-0.250

导入至 SIMCA 13.0 软件中，绘制 PCA 得分图。如图 6 所示，PCA 显示，可将样品大体分为 4 类，分类结果与 HCA 结果保持一致。

2.7.3 OPLS-DA 为了进一步分析引起样品质量差异性的原因，本研究基于 HCA 与 PCA 结果，采用 OPLS-DA 模型进行有监督的判别分析，模型自动拟合后，X 矩阵解释率 $R^2_X=0.915$ ，模型稳定性

参数 $R^2_Y=0.857$, 预测能力参数 $Q^2=0.558$, 均大于 0.5, 表明所建立的 OPLS-DA 模型拟合能力、稳定性、预测能力良好。经 OPLS-DA, 得到 OPLS-DA 得分图 (图 7) 及变量重要性投影值 (variable importance in projection, VIP) 图 (图 8)。

由 OPLS-DA 得分图可知, 20 批补中益气产品分为 4 类, 分类结果与 HCA、PCA 结果均相吻合。

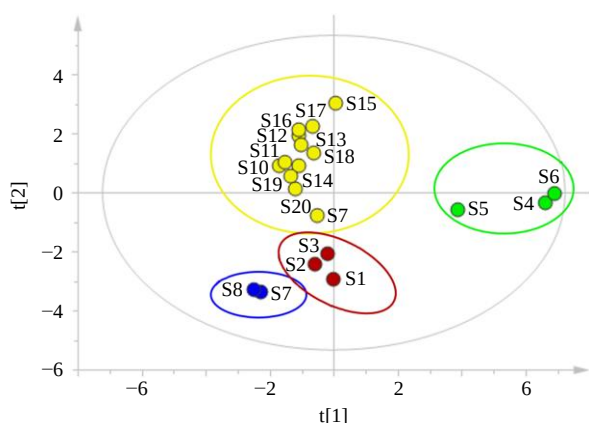


图 6 20 批补中益气产品主成分得分图

Fig. 6 PCA score chart of 20 batches of Buzhong Yiqi products

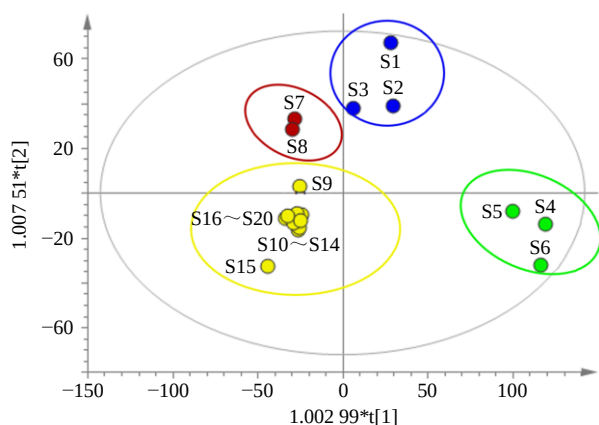


图 7 补中益气产品 OPLS-DA 得分图

Fig. 7 OPLS-DA scores chart of Buzhong Yiqi products

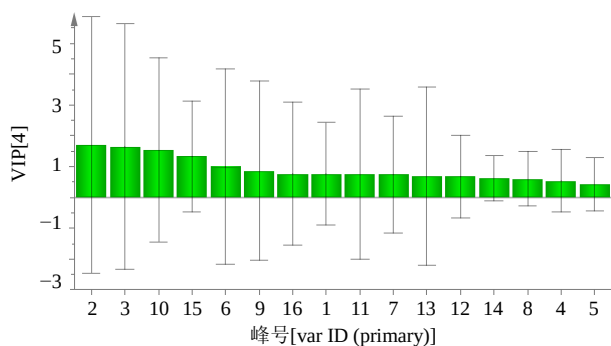


图 8 16 个共有峰的 VIP 值

Fig. 8 VIP value chart of 16 common peaks

在 VIP 图中, 将 16 个共有峰峰面积的 VIP 值大小依次排列, 以 $VIP>1$ 为筛选标准, 共得到 $VIP>1$ 的共有峰, 分别为峰 2 (肌苷, $VIP=1.703\ 7$)、峰 3 (胸苷, $VIP=1.648\ 1$)、峰 10 (橙皮苷, $VIP=1.548\ 6$)、峰 15 (甘草酸, VIP 值 $=1.327\ 5$)、峰 6 (毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷, VIP 值 $=1.000\ 1$)。上述 5 种化学成分对样品分类具有显著性影响, 是引起补中益气产品质量差异的主要潜在标志性成分。其中, 甘草酸来源于甘草, 橙皮苷来源于陈皮, 毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷、肌苷、胸苷主要来源于黄芪。研究表明, 甘草酸、橙皮苷、毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤等相关药理作用^[41-43], 与补中益气口服液在治疗炎症、肿瘤方面疾病相吻合。

HCA 结果显示, 20 批样品可聚为 4 类, 其中水丸样品分为一类, 浓缩丸分为一类, 蜜丸分为一类, 余下口服液分为一类; PCA 与 OPLS-DA 所得分类结果与 HCA 分类结果保持一致; 经 OPLS-DA 得到 VIP 值 >1 的共有峰为峰 2、3、10、15、6, 以上共有峰对应成分为差异标志物。

针对不同剂型补中益气产品的分类情况, 在此作出分析。浓缩丸在制备工艺过程中需先提取生姜与陈皮挥发油, 将药渣与黄芪、白术、升麻、柴胡、大枣加水煎煮 2 遍, 滤过, 滤液浓缩为稠膏, 再将党参与当归粉碎成细粉, 取甘草部分粉碎成细粉, 部分制成浸膏; 将上述各膏与粉末混匀, 加入挥发油, 混匀, 制丸, 干燥, 打光, 即得浓缩丸。

在制备工艺中, 浓缩丸未将全部药材煎煮提取, 直接将党参、当归与部分甘草粉末加入其中, 且浓缩丸亦未进行醇沉操作, 制备工艺的区别将会导致补中益气产品中相关成分含量的差异性。在相似度数据中, 浓缩丸与 3 批水丸样品两两比较的相似度为 0.678~0.953; 与 2 批蜜丸样品两两比较的相似度为 0.512~0.654; 与剩下的 12 批样品 (合剂与口服液) 两两比较的相似度为 0.473~0.881。

由于合剂与口服液将 10 味药材全部进行煎煮, 并将所得滤液浓缩, 醇沉; 水丸与蜜丸在制备工艺中取八味药材直接粉碎, 利用生姜、大枣的煎液与炼蜜制成相应丸剂。浓缩丸与水丸、蜜丸、合剂、口服液的制备过程差异性较大, 在 PCA 与 OPLS-DA 得分图中, S4~S6 3 个浓缩丸样品距离水丸、蜜丸、合剂、口服液样品均较远。

在水丸的制备工艺中, 同样未使用醇沉, 但由

于水丸与蜜丸均取 8 味药材直接粉碎制丸, 因此水丸与蜜丸差异性较小。相似度数据结果表明, 水丸与蜜丸相似度为 0.742~0.946; 与合剂、口服液相似度数据为 0.593~0.881。PCA 与 OPLS-DA 得分图中, 水丸与蜜丸距离较近, 与合剂、口服液样品距离相对较远。

3 讨论

本实验考察了不同供试品制备方法(正丁醇萃取口服液样品, 甲醇稀释口服液样品)、发现利用甲醇稀释样品所得色谱图信息较正丁醇萃取全面, 最终确定供试品制备方法为甲醇稀释补中益气口服液。在指纹图谱分析方法的建立和探索中, 先后考察了不同水相(水、0.1%甲酸水溶液、0.1%磷酸水溶液、0.2%甲酸水溶液)对指纹图谱的影响。根据色谱图可知, 采用乙腈-0.2%甲酸水溶液进行梯度洗脱, 获得的指纹图谱基线平稳, 且分离度良好。在柱温(25、30、35℃)、体积流量(0.60、0.80、1.00 mL/min)的考察中, 柱温 35℃, 体积流量 0.80 mL/min 所得色谱图信息全面, 分离度较好。在多波长 210、230、245、260、270、280、290、300、310、330 nm 扫描下, 260 nm 处的色谱峰峰数较多, 峰形、分离度均良好, 各峰吸收均匀, 因此选取 260 nm 为补中益气口服液指纹图谱的检测波长。

指纹图谱分析结合化学模式识别技术, 已在中药质量控制研究中得到了广泛应用^[44-46], 指纹图谱的相似度评价结合 HCA、PCA、OPLS-DA 等化学计量学手段, 可以用于综合评价中药制剂的质量优劣, 综合辨析其质量标志物, 避免了单一成分含量不能正确地表征质量属性的完整性。本研究基于 HPLC 指纹图谱, 结合化学模式识别, 在后续研究中从多角度、多方位为补中益气口服液的质量控制提供参考。

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: 1065-1066.
[2] 姜文清, 谷学珍. 补中益气汤方解及临床新用 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(12): 43-44.
[3] 叶晓声, 谢燕芬. 补中益气汤加减联合穴位贴敷治疗功能性便秘患者的效果 [J]. 中国民康医学, 2020, 32(6): 113-114.
[4] 高璟春, 张金超, 陈瑶, 等. 补中益气汤的 LC-MS 分析及其对免疫抑制小鼠的调节作用 [J]. 中草药, 2006, 37(8): 1134-1137.
[5] 宋振, 王世荣. 补中益气汤对脾胃虚弱型胃痞(慢性胃

炎)诊治疗效观察 [J]. 医学理论与实践, 2021, 34(6): 954-956.

- [6] 郝红梅, 田文婧. 补中益气汤对运动性疲劳大鼠血清 SOD、MDA、GSH-XP 含量的影响 [J]. 山西中医学院学报, 2014, 15(3): 27-28.
[7] 本刊编辑部. 补中益气丸(合剂、口服液)临床应用解析 [J]. 中国社区医师, 2010, 26(5): 16.
[8] 王贞丽. 中药指纹图谱构建的研究进展 [J]. 实用医药杂志, 2014, 31(11): 1040-1043.
[9] Khan T A, Rahman M M, Alamgir Kabir M, et al. Antioxidant activity and HPLC fingerprinting profile of ethanolic extract of *Euphorbia cotinifolia* Bark. from Bangladesh [J]. *J Adv Med Med Res*, 2018, 27(5): 1-8.
[10] 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.
[11] 荆文光, 张权, 邓哲, 等. 指纹图谱、多成分定量与化学计量学相结合的厚朴药材质量评价 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(5): 975-982.
[12] Mei J, Huang Y, Crommen J, et al. Quality evaluation of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen using supercritical fluid chromatography-mass spectrometry and chemical pattern recognition [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 221: 115029.
[13] 张永昕, 李莎恩, 段付军, 等. 补中益气丸(水丸)的中药指纹图谱研究 [J]. 中国药业, 2019, 28(23): 4-9.
[14] 马宁. 补中益气丸质量标准提高及其指纹图谱研究 [D]. 兰州: 甘肃中医学院, 2014.
[15] 陈锦富. 补中益气丸指纹图谱及其质量控制模式的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2009.
[16] 胡静. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 结合诊断离子与分子网络策略解析当归补血汤的化学成分 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
[17] 孙健, 刘子维, 刘莹, 等. UPLC-Q-TOF-MS^E 技术结合 UNIFI 筛查平台的加味逍遥丸化学成分 [J]. 中国药物警戒, 2023, 20(2): 181-190.
[18] 李蓉蓉. 基于液质联用技术的恒山黄芪中特征成分研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
[19] 续艳丽, 李晨曦, 杨飞霞, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术分析经典名方芍药甘草汤的化学成分 [J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(6): 938-948.
[20] 陈两绵, 刘晓谦, 张永欣, 等. 茶藨子叶状层菌中核苷类成分的 UPLC-Q-TOF-MS 定性分析和 HPLC 含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(12): 2912-2922.
[21] 安莉, 汪红, 马婧玮, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS/MS 和生物信息学探讨铁棍山药皮中化学成分的药用和营养价值 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 1-9.
[22] 崔琳琳, 包永睿, 王帅, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速

- 鉴定补肺健脾方的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(9): 184-193.
- [23] 田萍, 马开, 梁瑞峰, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的真武汤化学成分分析 [J]. 中药材, 2022(5): 1148-1157.
- [24] 胡瀚文, 赵永艳, 杨天龙, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 的川佛手化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 148-155.
- [25] 乔日发. 枳壳质量标志物的研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.
- [26] 王翌臣, 王焕军, 张玲, 等. 大狼把草的化学成分液质联用快速鉴定分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 80-87.
- [27] 安太勇, 陈晓虎, 张梅, 等. UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析川党参的化学成分 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1533-1542.
- [28] 魏飞亭. 枳壳的成分分析与多组分药动学研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.
- [29] 林彤, 段金殿, 钱大玮, 等. HPLC-MS/MS 联用技术分析鉴定苏薄荷中的黄酮类成分 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(2): 111-115.
- [30] 颜昱, 李军, 宋月林, 等. 利用 HPLC-IT-TOF-MS 表征通关藤化学轮廓 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5051-5060.
- [31] 郭敏娜, 刘素香, 赵艳敏, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的柴胡化学成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2044-2052.
- [32] 于蓓蓓, 闫雪生, 周洪雷. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 谱-效相关的柴胡-黄芩药对解热质量标志物的筛选及含量测定方法的建立 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 1983-1992.
- [33] 朱赞斐, 谭善忠, 王洪兰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的益气健脾颗粒化学成分分析 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3601-3613.
- [34] 李渊. 柴归颗粒的化学成分及其体内过程研究 [D]. 太原: 山西大学, 2020.
- [35] 宋宗华. 苓桂术甘汤药效物质基础研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2002.
- [36] 陈晶, 傅欣彤, 陈有根, 等. 基于 UHPLC-QE Plus-MS/MS 法分析柴黄颗粒及柴胡中化学成分 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4634-4644.
- [37] 郑伟, 时海燕, 王平, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap-HRMS 技术分析半夏白术天麻汤的化学成分及入血成分 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(22): 2331-2339.
- [38] 郑单单, 魏文峰, 霍金海, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析芪风固表颗粒化学成分 [J]. 中成药, 2020, 42(6): 1649-1657.
- [39] 叶耀辉, 史毅, 张博文, 等. 不同产地北柴胡药材的 UPLC/Q-TOF-MS 指纹图谱分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18): 124-129.
- [40] 焦阳, 尹海波, 张乐, 等. 基于 ICP-MS 对不同产地小根蒜无机元素的主成分分析和聚类分析 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2063-2066.
- [41] 李葆林, 麻景梅, 田宇柔, 等. 甘草中新发现化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2438-2448.
- [42] 王振东, 巩会杰, 马俊文. 橙皮苷诱导人胃癌 AGS 细胞凋亡机制的研究 [J]. 中草药, 2019, 50(22): 5484-5491.
- [43] 冯慧敏, 李成义, 何军刚, 等. 红芪化学成分和药理作用研究进展及质量标志物(Q-Marker)的预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2831-2842.
- [44] 彭亮, 杨冰月, 张琳, 等. 野生与栽培远志 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 4998-5003.
- [45] 黄建猷, 胡筱希, 麦婉婷, 等. 指纹图谱及多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地消瘤藤质量 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4334-4340.
- [46] 赵宏苏, 赵茹, 乔金为, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别绿萼梅质量标志物的评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1345-1353.

[责任编辑 郑礼胜]