

## 补肾强身片 UPLC 指纹图谱

林秀莲<sup>1</sup>, 宋粉云<sup>2\*</sup>, 李 华<sup>3</sup>, 黄寿辉<sup>3</sup>

(1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广东药科大学药学院, 广东 广州 510006; 3. 广东省药品检验所, 广东 广州 510180)

**摘要:** 目的 建立补肾强身片(淫羊藿、菟丝子、金樱子等) UPLC 指纹图谱。方法 该药物 50% 乙醇提取液的分析采用 Agilent SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm); 以乙腈-0.1% 磷酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 检测波长 215 nm; 柱温 40 °C。再通过聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘判别分析对指纹图谱进行评价。结果 12 批样品的 UPLC 指纹图谱中有 20 个共有峰, 并鉴定出 9 个(原儿茶酸、红景天苷、绿原酸、金丝桃苷、特女贞苷、朝藿定 C、淫羊藿苷、山柰素、宝霍苷 I), 相似度 0.843 ~ 0.970。12 批样品可分成 3 类, 并找到 4 个差异标志物, 包括特女贞苷和绿原酸。结论 该方法简便可靠, 可用于补肾强身片的质量控制。

**关键词:** 补肾强身片; UPLC 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)03-0551-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.023

## UPLC fingerprints of Bushen Qiangshen Tablets

LIN Xiu-lian<sup>1</sup>, SONG Fen-yun<sup>2\*</sup>, LI Hua<sup>3</sup>, HUANG Shou-hui<sup>3</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. Guangdong Provincial Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish the UPLC fingerprints of Bushen Qiangshen Tablets (*Epimedii Folium*, *Cuscutae Semen*, *Rosae Laevigatae Fructus*, etc.). **METHODS** The analysis of 50% ethanol extract of this drug was performed on a 40 °C thermostatic Agilent SB-C<sub>18</sub> column (100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 0.5 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 215 nm. Then the fingerprints were evaluated by cluster analysis, principal components analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis. **RESULTS** There were twenty common peaks in the UPLC fingerprints of twelve batches of samples, nine of which (protocatechuic acid, salidroside, chlorogenic acid, hyperin, specnuezhenide, epimedin C, icariin, kaempferide and baohuoside I) were identified, with the similarities of 0.843 - 0.970. Twelve batches of samples could be divided into three types, and four differential markers, including specnuezhenide and chlorogenic acid, were found out. **CONCLUSION** This simple and reliable method can be used for the quality control of Bushen Qiangshen Tablets.

**KEY WORDS:** Bushen Qiangshen Tablets; UPLC fingerprints; cluster analysis; principal components analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis

补肾强身片是由淫羊藿、菟丝子、金樱子、女贞子、狗脊(烫)5味药材加工制成的中药成方制

剂,具有补肾强身的功效,临床上主要用于治疗腰酸足软、头晕耳鸣、眼花心悸等<sup>[1]</sup>,其质量标准

收稿日期: 2016-09-20

基金项目: 上海市药物(中药)代谢产物研究重点实验室开放课题(2015SHDX1001)

作者简介: 林秀莲(1989—),女,硕士生,从事现代分析方法在中药质量控制中的应用研究。Tel: 13418015391, E-mail: xiulianlin@163.com

\*通信作者: 宋粉云(1965—),女,硕士,教授,从事现代分析方法在中药质量控制中的应用研究。Tel: (020) 39352136, E-mail: songfenyun2011@163.com

收载于《卫生部药品标准中药成方制剂(第15册)》<sup>[2]</sup>,采用显微鉴别、颜色反应和薄层鉴别进行质量评价,其中供试品溶液制备方法简单,但存在杂质干扰、专属性差等问题<sup>[3]</sup>。目前,相关文献报道主要涉及淫羊藿苷<sup>[4]</sup>、金丝桃苷<sup>[5]</sup>、原儿茶酸<sup>[6]</sup>等成分含有量的测定,但中药复方制剂化学成分复杂,是多成分、多靶点起效,故仅测定单一化合物显然不能全面反映其整体质量情况。由于中药指纹图谱能兼顾中药复方制剂成分的复杂性和相关性<sup>[7]</sup>,而且补肾强身片的相关研究尚未见报道,故本实验将建立其UPLC指纹图谱,以期为该药物的质量控制提供科学依据。

## 1 仪器与试剂

岛津 Nexera LC-30A 超高效液相色谱仪,配置 LC30-AD 二元梯度泵、SIL-30AC 进样器、SPD-M30A PDA 检测器、CTO-20AC 柱温箱; Sartorius CP224S、CP225D 电子天平; KQ-300DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q 超纯水机。

乙腈为色谱纯(美国 Honeywell 公司); 甲醇和磷酸为分析纯(广州化学试剂厂)。

红景天苷(批号 110818-201507)、特女贞苷(批号 111926-201404)、金丝桃苷(批号 111521-201507)、绿原酸(批号 110753-201415)、原儿茶酸(批号 110809-201205)、山柰素(批号 110861-201310)、淫羊藿苷(批号 110737-201516)、朝藿定 C(批号 111780-201503)对照品均购自中国食品药品检定研究院。淫羊藿(批号 20150920)、女贞子(批号 20150920)、菟丝子(批号 1603159101)、狗脊(批号 20150920)、金樱子(批号 20150920)均购自安国市祁澳中药饮片有限公司,经广东省药品检验所林锦锋副主任中药师鉴定为正品。

补肾强身片共 12 批,购自北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂(编号 A1~A6)和景忠山国药(唐山)有限公司(编号 B1~B6)。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm × 4.6 mm, 2.7 μm); 流动相 0.1% 磷酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~14 min, 5%~15% B; 14~42 min, 15%~51% B); 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 40 °C; 检测波长 215 nm; 进样量 2 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取补肾强身片 20 片,除去包

衣,研细,精密称取约 0.3 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,放冷,50% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 对照品溶液 精密称取各对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含红景天苷 20.7 μg、特女贞苷 21.9 μg、金丝桃苷 23.3 μg、绿原酸 21.0 μg、原儿茶酸 20.5 μg、山柰素 21.6 μg、淫羊藿苷 23.5 μg、朝藿定 C 23.8 μg 的溶液,即得。

2.2.3 药材溶液 按照补肾强身片的制备工艺,将狗脊和菟丝子粉碎成粉末,淫羊藿、女贞子和金樱子制成浸膏,根据处方比例称取,按“2.2.1”项下方法处理,即得。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一供试品溶液(批号 15120513),在“2.1”项色谱条件下进样 6 次,以 9 号峰(图 1)为参照,测得 20 个共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.5%,相对峰面积 RSD 均小于 2.1%,相似度不低于 0.97,表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一批样品(批号 15120513),平行制备 6 份供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定,以 9 号峰(图 1)为参照,测得 20 个共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.5%,相对峰面积 RSD 均小于 2.7%,相似度不低于 0.99,表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 15120513),在“2.1”项色谱条件下于 0、2、4、8、12、24 h 测定,以 9 号峰(图 1)为参照,测得 20 个共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 0.7%,相对峰面积 RSD 均小于 2.9%,相似度 1.0,表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4 指纹图谱的建立 按“2.2.1”项下方法制备 12 批供试品溶液,各取 2 μL,在“2.1”项色谱条件下测定,分析 UPLC 指纹图谱,确定 20 个共有峰,编号 1~20(图 1)。

### 2.5 共有峰归属与鉴定

2.5.1 药材归属 取“2.2.3”项下药材溶液各 2 μL,进样分析,结果见表 1。

2.5.2 成分鉴定 取“2.2.2”项下对照品溶液 2 μL,进样分析,比较样品色谱图与对照品的保留时间,鉴定了 9 个色谱峰,分别为原儿茶酸(3 号峰)、红景天苷(5 号峰)、绿原酸(6 号峰)、金丝桃苷(10 号峰)、特女贞苷(12 号峰)、朝藿

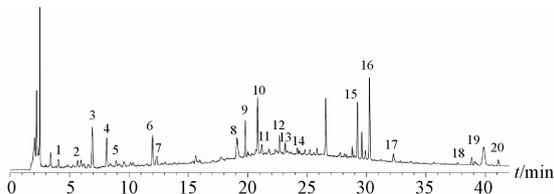


图1 UPLC 指纹图谱共有峰

Fig. 1 Common peaks of UPLC fingerprints

表1 药材归属

Tab. 1 Ownerships of medicinal materials

峰号	淫羊藿	女贞子	菟丝子	金樱子	狗脊
1	+	-	-	+	-
2	-	-	-	-	+
3	+	+	-	+	+
4	-	-	+	-	-
5	-	+	-	-	-
6	+	-	+	-	-
7	+	-	+	-	-
8	-	-	+	-	+
9	-	-	+	-	+
10	+	-	+	-	-
11	-	-	+	-	-
12	-	+	-	-	-
13	+	-	+	-	-
14	-	+	-	-	+
15	+	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-
17	+	-	+	-	-
18	+	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-

注：+表示检测出该成分，-表示未检测出该成分

定C (15号峰), 淫羊藿苷 (16号峰), 山柰素 (17号峰), 宝藿昔I (20号峰)。色谱图见图2。

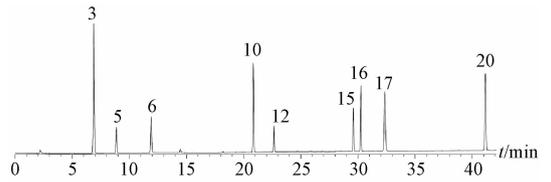


图2 对照品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of reference substances

2.6 相似度评价 将12批样品的指纹图谱(图3)导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012A版(国家药典委员会)”,以A1为参照,采用平均数法生成对照图谱,进行相似度评价<sup>[8]</sup>,结果见表2,可知2个厂家各批样品质量存在一定差异。

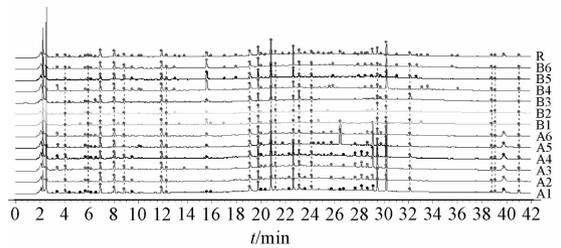


图3 12批样品UPLC指纹图谱

Fig. 3 UPLC fingerprints of twelve batches of samples

表2 UPLC 指纹图谱相似度

Tab. 2 Similarities of UPLC fingerprints

厂家	编号	相似度	相似度	相似度	相似度
		(厂内, 0~42 min)	(厂间, 0~42 min)	(厂间, 0~22 min)	(厂间, 22~42 min)
北京同仁堂	A1	0.974	0.970	0.980	0.969
	A2	0.969	0.955	0.974	0.945
	A3	0.979	0.957	0.982	0.973
	A4	0.980	0.958	0.986	0.971
	A5	0.934	0.882	0.975	0.848
	A6	0.939	0.890	0.977	0.845
景忠山国药	B1	0.939	0.843	0.958	0.584
	B2	0.953	0.912	0.981	0.779
	B3	0.939	0.864	0.980	0.616
	B4	0.958	0.936	0.967	0.883
	B5	0.977	0.934	0.966	0.884
	B6	0.976	0.936	0.971	0.874

2.7 聚类分析 以共有峰峰面积为变量,导入SPSS 22.0软件中,选择欧氏距离平方作为测度进行聚类分析,结果见图4。由图可知,12批样品分为3类,其中A1~A4归为一类,A5~A6、B4~

B6归为一类,B1~B3归为一类,与相似度评价基本一致。

2.8 主成分分析 主成分分析可反映数据原始状态,直观显示不同样品间的整体差异<sup>[9]</sup>。将共有

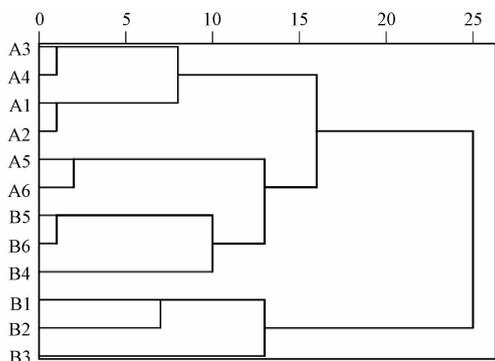


图4 聚类分析 (CA) 树状图  
Fig. 4 CA dendrogram

峰峰面积输入 Excel 表格, 得到  $12 \times 20$  数据矩阵, 导入 SIMCA-P13.0 软件中进行主成分分析, 结果见图 5。由图可知, 12 批样品可分为 3 组, 其中 A1 ~ A4 为一组, A5 ~ A6、B4 ~ B6 为一组, B1 ~ B3 为一组, 与聚类分析一致。

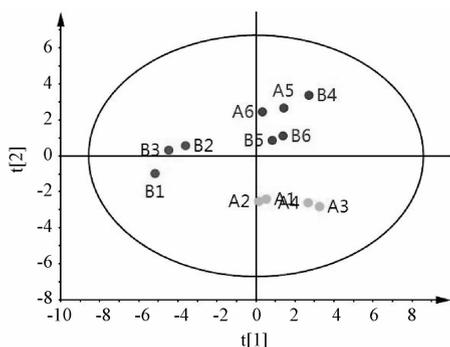


图5 主成分分析 (PCA) 得分图  
Fig. 5 PCA score plot

2.9 正交偏最小二乘判别分析 OPLS-DA 将正交信号校正方法 (OSC) 与偏最小平方法 (PLS) 结合, 并对 PLS 进行修正, 过滤掉与反应没有直接关系的变化, 更好地区分组间差异, 并找到导致差异的标志物<sup>[10-11]</sup>。本实验在聚类分析和主成分分析的基础上, 采用正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 过滤与模型分类不相关的正交信号, 获得 OPLS-DA 模型, 具有较高的解释率和预测率, 其模型质量参数  $R^2X$  为 0.821,  $R^2Y$  为 1,  $Q^2$  为 0.963。从得分矩阵图 (图 6) 可看出, 3 组样品聚类良好, 显著分离。结合变量重要性投影 (VIP) 法, 筛选出具有统计学意义的 4 个差异标志物 ( $VIP > 1$ , 图 7), 其影响程度依次为峰 7 > 峰 1 > 峰 12 (特女贞苷) > 峰 6 (绿原酸), 其载荷图见图 8 (图中每 1 个点代表 1 个化合物, 偏离

中心越远, 表明对应变量对模型的贡献越大)。

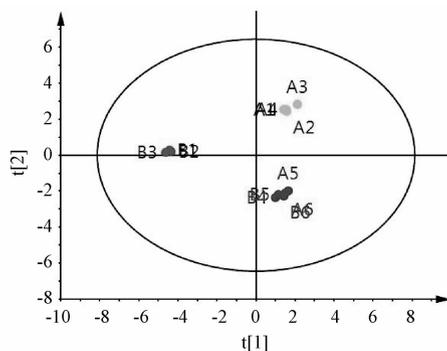


图6 正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 得分散点图  
Fig. 6 OPLS-DA score scatter plot

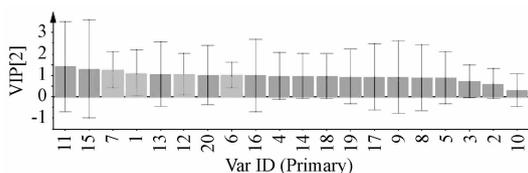


图7 VIP图  
Fig. 7 VIP plot

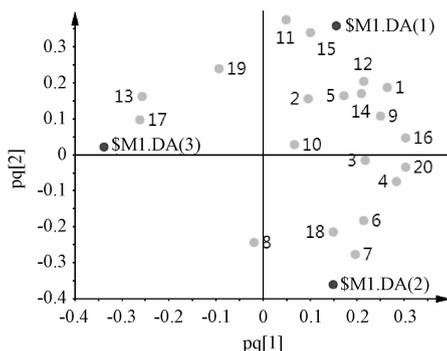


图8 载荷散点图  
Fig. 8 Loading scatter plot

### 3 讨论

补肾强身片君药淫羊藿的主要活性成分为黄酮类, 其代表性成分有淫羊藿苷、朝藿定 C、宝藿苷-I 等<sup>[12]</sup>, 另外组方中其他中药材的主要成分有黄酮<sup>[13]</sup>、萜类<sup>[14]</sup>、苯乙醇苷<sup>[15]</sup>等。根据其结构和性质, 本实验分别以不同比例乙醇-水、甲醇-水为提取溶剂, 同时考察加热回流和超声 2 种提取方式, 发现 50% 乙醇提取率最高, 而且毒性较低, 故选择其作为提取溶剂; 加热回流和超声提取所得到的色谱图无明显区别, 考虑到操作简便, 选择超声提取。再考察超声提取 20、30、40、60 min, 发

现当提取时间超过 30 min 后, 所得到的色谱图无明显变化, 故选择超声提取 30min。综上所述, 样品处理方法为 50% 乙醇超声提取 30 min。

中药成方制剂化学成分复杂, 极性范围较大, 故采用反相色谱梯度洗脱法。本实验考察了 3 种不同规格的色谱柱, 发现 Agilent SB C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm) 较合适。由于黄酮类化合物常带有酚羟基, 未解离的羟基与固定相作用较强, 导致拖尾现象发生, 故在流动相中加入酸调节 pH。比较了甲醇、乙腈与水、醋酸、甲酸、磷酸溶液等流动相组合, 发现乙腈-0.1% 磷酸为最佳流动相。对柱温 (30、35、40 °C) 进行了考察, 发现 40 °C 时分离度最佳。PDA 检测器于 190 ~ 400 nm 波长处检测样品, 发现在 215 nm 下主要色谱峰峰面积最大, 检测到的色峰峰数量最多。综上所述, 色谱条件为以乙腈-0.1% 磷酸为流动相, 在 40 °C 下梯度洗脱, 检测波长 215 nm。

本实验建立了补肾强身片的 UPLC 指纹图谱, 标定 20 个共有峰, 确定其归属药材, 并指出其中 9 种化学成分, 并发现不同厂家样品的质量存在一定差异。补肾强身片现行标准比较简单, 难以保证其质量的稳定, 而指纹图谱能更全面表征药物质量信息, 并反映其一致性和稳定性<sup>[16]</sup>, 可为完善补肾强身片的质量标准提供参考。

#### 参考文献:

[ 1 ] 周嵩煜, 宋嵩文, 庞云娟. 补肾强身胶囊微生物限度检查方法的探讨[J]. 中成药, 2009, 31(8): 1306-1308.  
[ 2 ] 卫生部药品标准. 中药成方制剂: 第 15 册[S]. 1997: 9-10.  
[ 3 ] 王继玉, 卑国斌. 改进补肾强身片淫羊藿苷薄层色谱鉴别

方法的建议[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(S1): 207-208.  
[ 4 ] 孙 明, 郑爱华. HPLC 测定补肾强身片中淫羊藿苷的含量[J]. 中成药, 2006, 28(8): 1231-1232.  
[ 5 ] 刘爱香. UPLC 法测定补肾强身胶囊中金丝桃苷的含量[J]. 中国药师, 2013, 12(3): 465-467.  
[ 6 ] 穆天慧, 方慧祥, 黎海存. HPLC 法测定补肾强身片中原儿茶酸的含量[J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(9): 13-14.  
[ 7 ] 罗格莲, 郑孝勇. 指纹图谱技术在中药鉴定中的应用[J]. 药学研究, 2013, 32(2): 112-114.  
[ 8 ] 姚志红, 潘宇明, 戴 毅, 等. 3 种市售中药复方制剂消炎利胆片的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药学杂志, 2013, 45(20): 1530-1534.  
[ 9 ] 李 娟, 张 松, 秦雪梅, 等. 基于 NMR 代谢组学技术的款冬花生品与蜜炙品化学成分比较[J]. 中草药, 2015, 46(20): 3009-3016.  
[10] 薛 琪, 聂晓莉, 罗 仁, 等. 基于 OPLS-DA 的高脂血症血浆<sup>1</sup>H-NMR 研究[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(21): 3874-3877.  
[11] Liang J, Wu W Y, Sun G X, *et al.* A dynamic multiple reaction monitoring method for the multiple component quantification of complex traditional Chinese medicine preparations: Nihuang Shangqing pill as an example[J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1294: 58-69.  
[12] 王可可, 龚其海. 淫羊藿化学成分及药理作用的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(19): 16-21.  
[13] 阎 超, 胡歌红, 买尔旦·马合木提. 菟丝子的化学成分及药理作用研究概况[J]. 中国药物与临床, 2005, 5(9): 683-684.  
[14] 庄 彦, 何英姿, 王 彪, 等. 金樱子三萜类化学成分及其活性的研究进展[J]. 中药材, 2012, 35(1): 162-164.  
[15] 程 敏, 胡正海. 女贞子的生物学和化学成分研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(7): 1219-1221.  
[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.