

## 基于 HPLC 指纹图谱、多成分含量测定和 化学计量学的二地消渴合剂质量评价研究\*

孙丽芬<sup>1,2</sup>, 蔡依云<sup>3</sup>, 朱敏<sup>1\*\*</sup>, 安晓飞<sup>1</sup>, 吴磊<sup>1</sup>

(1. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029; 2. 南京中医药大学, 南京 210023; 3. 中国药科大学中药学院, 南京 211198)

**摘要** 目的: 建立二地消渴合剂的 HPLC 指纹图谱、多成分含量测定和化学计量学相结合的质量评价方法。方法: 采用 Acutfex PW - C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 - 0.1% 磷酸为流动相梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 285 nm, 建立二地消渴合剂的 HPLC 指纹图谱; 对 12 批二地消渴合剂中的 11 个成分 [5 - 羟甲基糠醛 (5 - HMF)、丹参素、绿原酸、咖啡酸、毛蕊异黄酮苷、毛蕊花糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 C、迷迭香酸、丹酚酸 B、芒柄花黄素] 进行含量测定, 并结合相似度评价、聚类分析、主成分分析及正交偏最小二乘 - 判别分析对二地消渴合剂质量进行综合评价。结果: 所测 11 个成分在各自浓度范围内线性关系良好 ( $r \geq 0.9996$ ), 平均加样回收率为 95.3% ~ 101.5%, RSD 为 1.1% ~ 2.3%。12 批样品的 HPLC 指纹图谱中共确定 18 个共有峰, 相似度均 > 0.960。12 批样品中上述 11 个成分的含量的范围依次在 43.40 ~ 65.70、219.43 ~ 274.70、119.00 ~ 164.78、11.87 ~ 18.17、42.80 ~ 56.86、10.01 ~ 20.71、8.21 ~ 14.73、40.15 ~ 57.39、43.29 ~ 60.29、755.22 ~ 1208.50、2.47 ~ 4.44 μg · mL<sup>-1</sup>。12 批二地消渴合剂可聚为 3 类, 不同批次间质量存在一定差异, 5 - HMF、丹酚酸 B 和绿原酸是影响样品质量的主要潜在标志物。结论: 该方法稳定可靠, 准确灵敏, 可用于二地消渴合剂的质量控制和综合评价。  
**关键词:** 二地消渴合剂; 指纹图谱; 含量测定; 化学计量学; 质量评价

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)12 - 2171 - 09

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024 - 0145

## Quality evaluation of Erdi Xiaoke mixture based on HPLC fingerprint, multi - component content determination and chemometrics\*

SUN Li - fen<sup>1,2</sup>, CAI Yi - yun<sup>3</sup>, ZHU Min<sup>1\*\*</sup>, AN Xiao - fei<sup>1</sup>, WU Lei<sup>1</sup>

(1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

**Abstract Objective:** To establish a quality evaluation method of Erdi Xiaoke mixture based on HPLC fingerprint, multi - component determination and chemometric analysis. **Methods:** The separation was performed on a 30 °C thermostatic Acutfex PW - C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, with the mobile phase comprising of acetonitrile - 0.1% phosphoric acid flowing at 1.0 mL · min<sup>-1</sup> in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 285 nm to establish HPLC fingerprint of Erdi Xiaoke mixture. Contents of 11 components [5 - hydroxymethyl furfural (5 - HMF), salviatic acid A, chlorogenic acid, caffeic acid, calycosin - 7 - glucoside,

\* 国家自然科学基金项目 (82074359); 南京药学会 - 常州四药医院药学科研基金项目 (2023YX027)

\*\* 通信作者 Tel: 13776609632; E - mail: zhumin0902@163.com

第一作者 Tel: 13879356843; E - mail: 3225057241@qq.com

acteoside, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C, rosmarinic acid, salvianolic acid B and formononetin] in 12 batches of Erdi Xiaoke mixture were determined, and similarity evaluation, cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were used to comprehensively evaluate the quality of Erdi Xiaoke mixture. **Results:** The 11 constituents showed good linear relationships within their respective ranges ( $r \geq 0.9996$ ), with average recovery rates of 95.3% – 101.5%, and the RSDs were in the range of 1.1% – 2.3%. There were 18 common peaks in the fingerprints for 12 batches of samples with the similarities above 0.960. The range of the content of the above 11 components in the 12 batches of samples were as follows as 43.40 – 65.70, 219.43 – 274.70, 119.00 – 164.78, 11.87 – 18.17, 42.80 – 56.86, 10.01 – 20.71, 8.21 – 14.73, 40.15 – 57.39, 43.29 – 60.29, 755.22 – 1208.50, 2.47 – 4.44  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . And 12 batches of Erdi Xiaoke mixture could be clustered into three categories with some differences in sample quality among different batches. In addition, 5-HMF, isochlorogenic acid B and chlorogenic acid were the main potential markers affecting the quality of Erdi Xiaoke mixture. **Conclusion:** This method is stable, reliable, accurate and sensitive, and can be used to control and comprehensively evaluate the quality of Erdi Xiaoke mixture.

**Keywords:** Erdi Xiaoke mixture; fingerprint; content determination; chemometrics; quality evaluation

糖尿病是影响人类健康的主要代谢性疾病之一,近年来流行病学资料表明我国糖尿病总体患病率呈现出上升的趋势,已达 11.2%,其中 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 占 90% 以上<sup>[1]</sup>。2 型糖尿病肾脏病 (type 2 diabetic kidney disease, T2DKD) 是由 T2DM 所导致的慢性肾脏病,主要临床表现为持续性的蛋白尿和肾功能减退,是导致终末期肾病 (end-stage kidney disease, ESKD) 和病人死亡的重要原因之一<sup>[2-3]</sup>。随着糖尿病总体患病率上升, T2DKD 患病人数也在逐年增加<sup>[4]</sup>。

二地消渴合剂是由熟地、生地、黄芪、丹参、麸炒白术、五味子、茵陈、天花粉、麦冬、丹参、郁金和山药共 12 味中药组成的复方制剂,是江苏省中医院内分泌科的临床经验方及代表方,方中熟地性温、滋阴益精,生地性寒、清热凉血,黄芪健脾益气,三者共为君药,山药补益脾脏、益肺生津,麦冬养阴润肺、益胃生津,五味子益气生津、补肾宁心,天花粉清热泻火、生津止渴,茯苓利水渗湿、宁心健脾,炒白术燥湿利水、健脾益气,茵陈清利湿热,全方健脾益气、养阴清热、利水渗湿、活血化痰。对于 T2DKD 早期气阴两虚兼内热之基本病机具有显著改善作用,可显著降低 T2DKD 早期患者蛋白尿水平,改善患者临床症状<sup>[5-7]</sup>。二地消渴合剂为医疗机构制剂,现有质量标准较为简单,仅包含薄层鉴别等,未收载含量测定项,难以对该制剂进行整体质量评价。本研究采用 HPLC 法建立二地消渴合剂的指纹图谱并结合化学模式识别进行分析评价,同时测定其中

11 个化学成分的含量,以弥补二地消渴合剂成分分析研究的空白,为该制剂质量标准的完善和进一步的新药开发提供药学研究基础。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Waters e 2695 型高效液相色谱仪配置 PDA 检测器 (沃特世科技有限公司); Acutfex PW-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 喆分医药科技有限公司); BP211D 型十万分之一分析天平 (赛多利斯公司); PL-S100TX 数显超声波清洗机 (康士洁超声波科技有限公司); Centrifuge 5430 R 高速冷冻离心机 (艾本德公司)。

### 1.2 试剂

对照品: 5-羟甲基糠醛 (5-HMF) (批号 MUST-22102711, 含量  $\geq 98\%$ )、丹参素 (批号 MUST-22050920, 含量 98.38%)、毛蕊花糖苷 (批号 MUST-22112712, 含量 99.37%)、异绿原酸 B (批号 MUST-23012705, 含量 98.27%)、异绿原酸 C (批号 MUST-22081001, 含量 99.77%)、芒柄花黄素 (批号 MUST-23033005, 含量 99.03%) 均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 绿原酸 (批号 110753-201314, 含量 96.6%)、咖啡酸 (批号 110885-200102, 含量 99.7%) 均购自中国食品药品检定研究院; 毛蕊异黄酮苷 (批号 J19HB174062, 含量  $\geq 98\%$ )、迷迭香酸 (批号 Y06A9K67402, 含量  $\geq 98\%$ )、丹酚酸 B (批号 N23HB202048, 含量  $\geq 98\%$ ) 均购自上海源叶生物科

技术有限公司。

乙腈、磷酸均为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。12批二地消渴合剂(批号 20230107、20230109、20230218、20230222、20230311、20230313、20230326、20230403、20230414、20230419、20230510、20230523,编号 S1~S12),均由江苏省中医院制剂部提供。熟地、生地、黄芪、丹参、麸炒白术、五味子、茵陈、天花粉、麦冬、丹参、郁金、山药 12 味中药饮片分购于马鞍山井泉中药饮片公司、贵州同德药业股份有限公司和安徽协和成药业饮片有限公司,经南京中医药大学附属医院钱芳主任中药师鉴定为正品,符合 2020 年版《中华人民共和国药典》相关要求。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

天津喆分 Acutfex PW-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0~9 min, 5%A→10%A; 9~13 min, 10%A→12%A; 13~20 min, 12%A→15%A; 20~40 min, 15%A→25%A; 40~53 min, 25%A→27%A; 53~71 min, 27%A→68%A; 71~77 min, 68%A→80%A; 77~82 min, 80%A),检测波长 285 nm,体积流量 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30℃,进样量 5 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 混合对照品溶液** 精密称取对照品 5-HMF、丹参素、绿原酸、咖啡酸、毛蕊异黄酮苷、毛蕊花糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 C、迷迭香酸、丹酚酸 B 和 芒柄花黄素分别置于 10 mL 量瓶中,加适量甲醇溶解,超声(500 W, 40 kHz)处理 15 min,冷却后用甲醇稀释至刻度,得到质量浓度依次为 2.00、1.02、1.13、0.86、1.45、1.08、0.83、1.30、1.10、1.64、1.14 mg·mL<sup>-1</sup>的各对照品储备液。精密吸取各对照品储备液适量,置于同一 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得混合对照品溶液(各成分质量浓度分别为 120.0、152.4、113.0、25.9、86.8、21.6、25.0、65.1、55.2、492.0、20.7 μg·mL<sup>-1</sup>),平行制作 2 份。

**2.2.2 供试品溶液** 精密量取二地消渴合剂 2 mL 于 10 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声(500 W, 40 kHz)处理 15 min,冷却后甲醇稀释至刻度,14 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液,即得。

**2.2.3 阴性样品溶液** 参照二地消渴合剂制备工艺,分别制备缺黄芪的阴性样品,缺丹参的阴性样品,缺茵陈的阴性样品,缺五味子的阴性样品,缺

地和熟地的阴性样品,缺丹参和茵陈的阴性样品,缺五味子、熟地、麦冬和麸炒白术的阴性样品,按“2.2.2”项下方法处理,即得。

### 2.3 HPLC 指纹图谱的建立

**2.3.1 精密度试验** 取样品 S1 适量,按“2.2.2”项方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次,记录峰面积。以保留时间适中且分离度较好的毛蕊异黄酮苷峰作为参照峰,结果显示,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0.070%~0.38% 和 0.79%~2.4%,表明仪器精密度良好。

**2.3.2 稳定性试验** 取样品 S1 适量,按“2.2.2”项方法制备供试品溶液,分别在室温放置 0、2、4、8、16、24 h 后,在“2.1”项色谱条件下进样测定,记录峰面积。以毛蕊异黄酮苷峰为参照峰,结果显示,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0.10%~0.29% 和 0.87%~2.6%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.3 重复性试验** 取样品 S1,按“2.2.2”项方法平行制备 6 份供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,测得 5-HMF、丹参素、绿原酸、咖啡酸、毛蕊异黄酮苷、毛蕊花糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 C、迷迭香酸、丹酚酸 B、芒柄花黄素含量的平均值分别为 44.73、226.54、121.43、13.03、44.41、18.96、11.39、43.10、43.45、756.77、3.52 μg·mL<sup>-1</sup>。以毛蕊异黄酮苷峰为参照峰,各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0.12%~0.19% 和 0.86%~2.4%,表明该方法重复性良好。

**2.3.4 指纹图谱生成及相似度评价** 12 批样品按照“2.2.2”项方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,得到样品色谱图,将色谱图依次导入《中药色谱特征图谱相似度评价系统》(2012 版)软件进行分析,以样品 S1 的图谱作为参照图谱,采用平均数法,设定时间窗宽度为 0.1 min,经多点校正后以 Mark 峰匹配生成对照指纹图谱(R)及 HPLC 特征指纹图谱。结果 12 批样品共标定 18 个共有峰,见图 1。记录相似度评价结果,可知 12 批样品与对照指纹图谱的相似度分别为 0.997、0.960、0.994、0.991、0.997、0.998、0.995、0.997、0.977、0.982、0.998、0.993,均>0.960,表明各批样品物质基础组成较为稳定。

**2.3.5 共有峰指认及归属** 将生成的对照图谱(R)与混合对照品及阴性样品溶液进行比对,共指认出

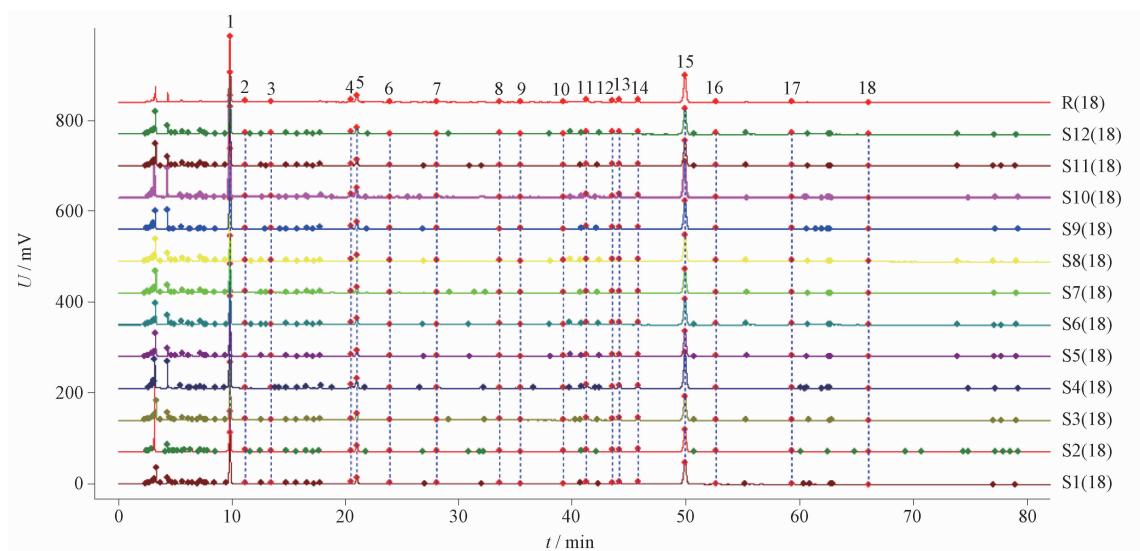


图1 二地消渴合剂 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of Erdi Xiaoke mixture

11 个色谱峰,分别为 5 - HMF(1 号峰)、丹参素(2 号峰)、绿原酸(5 号峰)、咖啡酸(6 号峰)、毛蕊异黄酮苷(8 号峰)、毛蕊花糖苷(9 号峰)、异绿原酸 B(10 号峰)、异绿原酸 C(12 号峰)、迷迭香酸(13 号峰)、丹酚酸 B(15 号峰)、芒柄花黄素(18 号峰)。其中,8、18 号峰归属于黄芪,2 号峰、13~17 号峰归属于丹参,3 号峰、5 号峰、7 号峰、10~12 号峰归属于茵陈,4 号峰归属于五味子,9 号峰为生地和熟地共有成分,6 号峰为丹参和茵陈共有成分,1 号峰为五味子、熟地、麦冬和麸炒白术共有成分,见图 2。

## 2.4 化学模式识别分析

**2.4.1 聚类分析** 使用 SPSS 25.0 软件对 12 批二地消渴合剂进行统计分析,将 18 个共有峰峰面积导入到软件,以平方欧氏距离作为测距,采用组间连接法对其进行聚类分析(cluster analysis, CA)。结果显示当平方欧氏距离为 5 时,12 批样品可分为 3 类,其中 S4、S10 和 S11 为 1 类, S8 和 S9 为 1 类,其余为 1 类,见图 3。表明在相似度较高的情况下,不同批次间的样品成分含量具有一定差异性。

**2.4.2 主成分分析** 为进一步比较二地消渴合剂不同批次间的质量差异,将 12 批二地消渴合剂样品的 18 个共有峰峰面积导入到 SPSS 25.0 进行主成分分析(principal component analysis, PCA),提取特征值 >1 的成分为主成分,得到 4 个主成分,结果见表 1。4 个成分的累计方差贡献率为 94.42%,能较好地代表样品中的大部分信息。运用 SIMCA 14.0 分析

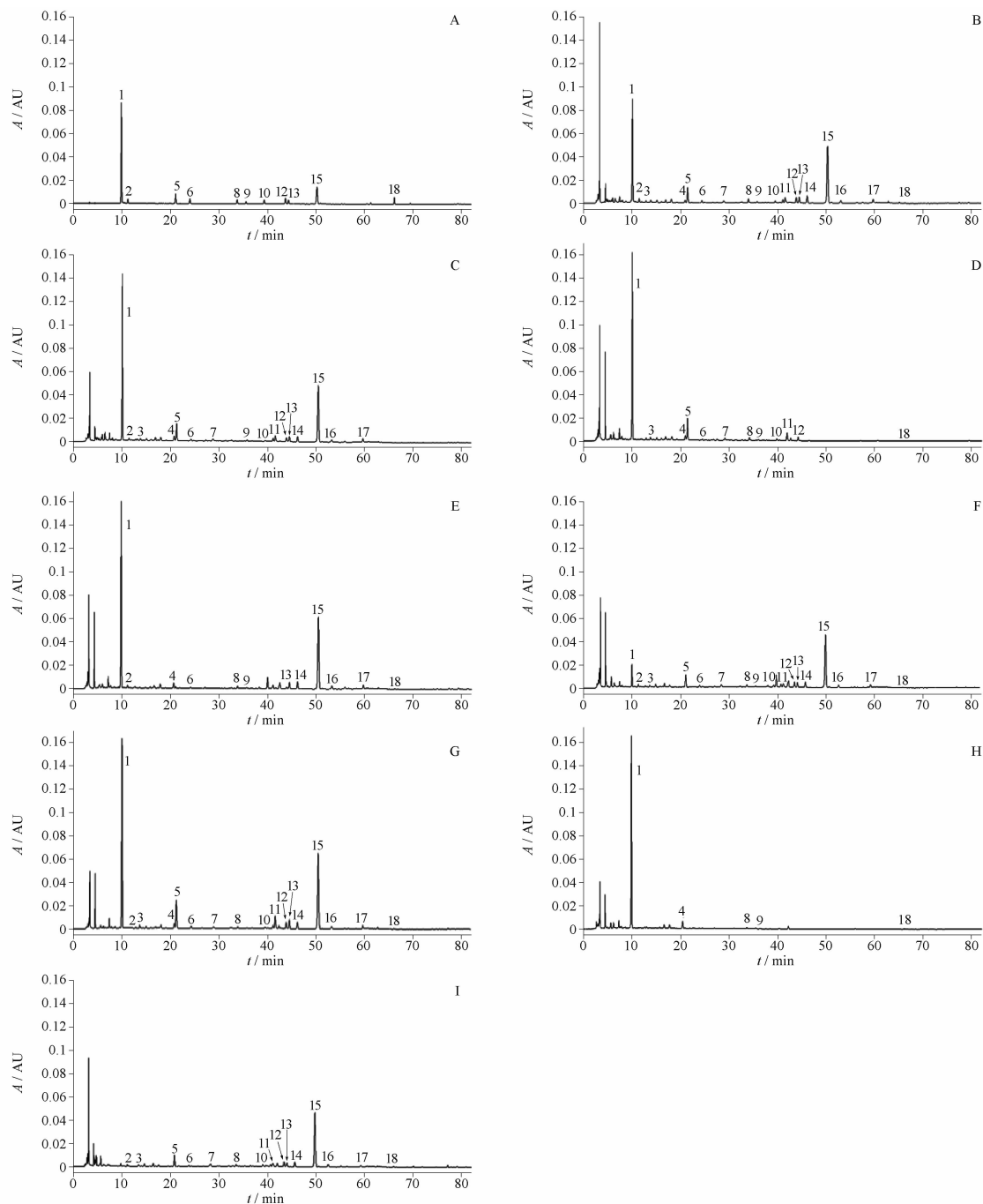
软件绘制主成分分析得分图,见图 4。从得分图可以看出,12 批样品散点分布可分为 3 类,其中 S4、S10 和 S11 为 1 类, S8 和 S9 为 1 类,其余为 1 类,与 CA 结果一致。

**2.4.3 正交偏最小二乘 - 判别分析** 为进一步比较 12 批二地消渴合剂化学成分的差异和寻找各批次含量之间的差异性标志化合物,将 12 批二地消渴合剂样品的 18 个共有峰峰面积导入到 SIMCA 14.1 软件中进行正交偏最小二乘 - 判别分析(partial least squares discrimination analysis, OPLS - DA),以变量重要性投影(variable importance in projection, VIP) >1.0 为标准进行筛选,见图 5。结果显示有 3 个成分 VIP >1,按照从大到小的顺序依次为 1 号峰(5 - HMF)、15 号峰(丹酚酸 B)、5 号峰(绿原酸),表明这 3 个成分是二地消渴合剂不同批次间质量差异贡献较大的标志物,可作为其质量控制的重点关注对象。

## 2.5 HPLC 含量测定

**2.5.1 专属性试验** 取混合对照品溶液、供试品溶液(S1)及各阴性样品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定。结果显示供试品溶液中各成分色谱峰分离度良好,保留时间与相应对照品一致,阴性无干扰,见图 2,表明该方法专属性良好。

**2.5.2 线性关系考察** 精密量取“2.2.1”项下的混合对照品溶液 0.2、0.4、1.0、1.6、2.0、4.0、6.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,在“2.1”



1. 5-HMF 2. 丹参素 (salvianic acid A) 5. 绿原酸 (chlorogenic acid) 6. 咖啡酸 (caffeic acid) 8. 毛蕊异黄酮苷 (calycosin-7-glucoside) 9. 毛蕊花糖苷 (acteoside) 10. 异绿原酸 B (isochlorogenic acid B) 12. 异绿原酸 C (isochlorogenic acid C) 13. 迷迭香酸 (rosmarinic acid) 15. 丹酚酸 B (salvianolic acid B) 18. 芒柄花黄素 (formononetin)

A. 混合对照品 (mixed reference solution) B. 供试品 (sample) C. 缺黄芪阴性样品 (negative sample without Astragali Radix) D. 缺丹参阴性样品 (negative sample without *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*) E. 缺茵陈阴性样品 (negative sample without *Artemisiae Scopariae Herba*) F. 缺五味子阴性样品 (negative sample without *Schisandrae Chinensis Fructus*) G. 缺生地 and 熟地阴性样品 (negative sample without *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata*) H. 缺茵陈和丹参阴性样品 (negative sample without *Artemisiae Scopariae Herba* and *Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*) I. 缺五味子、熟地、麦冬和麸炒白术阴性样品 (negative sample without *Schisandrae Chinensis Fructus*, *Rehmanniae Radix Praeparata*, *Ophiopogonis Radix* and fried *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*)

图 2 二地消渴合剂 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of Erdi Xiaoke mixture

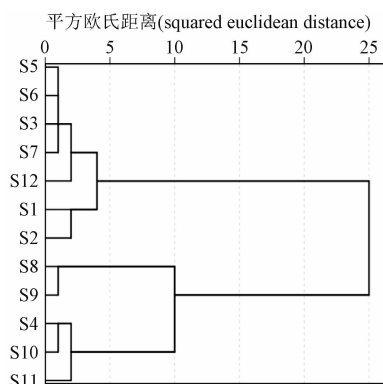


图3 12批二地消渴合剂聚类分析图

Fig. 3 CA of 12 batches of Erdi Xiaoke mixture

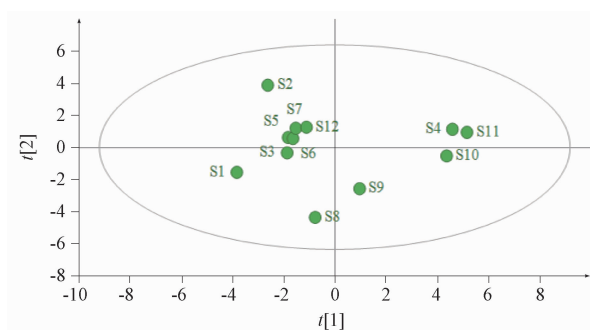


图4 12批二地消渴合剂 PCA 得分图

Fig. 4 PCA scores of 12 batches of Erdi Xiaoke mixture

表1 4个主成分因子的特征值和方差贡献率

Tab.1 Eigenvalues and variance contribution rates of four principal component factors

成分 (component)	特征值 (eigenvalue)	方差贡献率 (variance contribution rate)/%	累计方差贡献率 (cumulative variance contribution rate)/%
1	9.27	51.51	51.51
2	4.50	25.01	76.52
3	1.91	10.63	87.15
4	1.31	7.27	94.42

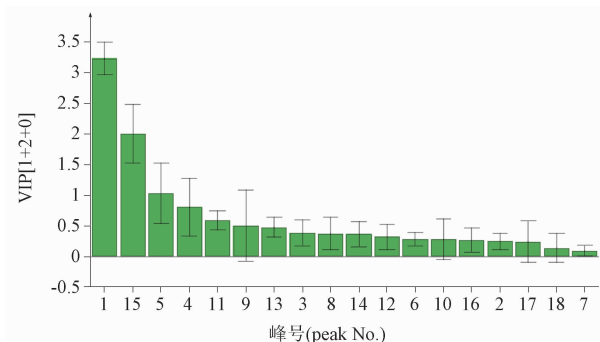


图5 12批二地消渴合剂中各成分的VIP值图

Fig. 5 VIP values of different ingredients in 12 batches of Erdi Xiaoke mixture

表2 各成分线性关系

Tab.2 Linear relationships of various constituents

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/(μg · mL <sup>-1</sup> )
5-HMF	$Y = 5.63 \times 10^4 X - 6.71 \times 10^3$	0.999 9	2.40 ~ 72.00
丹参素(salvianic acid A)	$Y = 2.43 \times 10^3 X + 1.09 \times 10^3$	0.999 6	3.05 ~ 91.44
绿原酸(chlorogenic acid)	$Y = 1.38 \times 10^4 X + 5.11 \times 10^3$	0.999 7	2.26 ~ 67.80
咖啡酸(caffeic acid)	$Y = 2.97 \times 10^4 X - 3.35 \times 10^2$	0.999 7	0.52 ~ 15.55
毛蕊异黄酮苷(calycosin-7-glucoside)	$Y = 1.72 \times 10^4 X - 2.87 \times 10^3$	0.999 8	1.74 ~ 52.06
毛蕊花糖苷(acteoside)	$Y = 7.21 \times 10^3 X - 1.43 \times 10^2$	0.999 8	0.43 ~ 12.96
异绿原酸B(isochlorogenic acid B)	$Y = 2.08 \times 10^4 X + 4.84 \times 10^2$	0.999 9	0.50 ~ 14.98
异绿原酸C(isochlorogenic acid C)	$Y = 1.55 \times 10^4 X + 3.60 \times 10^2$	0.999 6	1.30 ~ 39.06
迷迭香酸(rosmarinic acid)	$Y = 1.26 \times 10^4 X - 1.23 \times 10^3$	0.999 8	1.10 ~ 33.12
丹酚酸B(salvianolic acid B)	$Y = 6.20 \times 10^3 X + 2.64 \times 10^3$	0.999 8	9.84 ~ 295.20
芒柄花黄素(formononetin)	$Y = 3.93 \times 10^4 X - 6.11 \times 10^2$	0.999 9	0.41 ~ 12.43

项色谱条件下进样测定,记录峰面积。以质量浓度 X 为横坐标,对应色谱峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归,计算回归方程,结果见表 2,可知各成分在各自浓度范围内线性关系良好。

2.5.3 精密度试验 取样品 S1 适量,按“2.2.2”项

方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下连续进样测定 6 次,测得 5-HMF、丹参素、绿原酸、咖啡酸、毛蕊异黄酮苷、毛蕊花糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 C、迷迭香酸、丹酚酸 B 和芒柄花黄素峰面积的 RSD 分别为 1.6%、1.7%、1.1%、1.5%、1.3%、1.5%、

1.0%、1.7%、1.2%、1.3%、0.94%，表明仪器精密度良好。

**2.5.4 稳定性试验** 取样品 S1 适量，按“2.2.2”项方法制备供试品溶液，分别在室温放置 0、2、4、8、16、24 h 后，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得 5-HMF、丹参素、绿原酸、咖啡酸、毛蕊异黄酮苷、毛蕊花糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 C、迷迭香酸、丹酚酸 B 和芒柄花黄素峰面积的 RSD 分别为 0.79%、1.4%、1.3%、0.78%、2.0%、1.8%、1.8%、1.4%、1.3%、1.9%、1.7%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.5.5 重复性试验** 取样品 S1 适量，按“2.2.2”项方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得 5-HMF、丹参素、绿原酸、咖啡酸、毛蕊异黄酮苷、毛蕊花糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 C、迷迭香酸、丹酚酸 B 和芒柄花黄素含量的平均值分别为 44.46、227.31、121.93、12.93、44.62、18.52、11.90、42.89、43.39、756.67、3.34  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，RSD 分别为 2.9%、1.8%、1.9%、0.63%、1.9%、1.8%、1.8%、1.0%、1.5%、1.3%、1.9%，表明该方法重复

性良好。

**2.5.6 加样回收率试验** 精密吸取已知各成分含量的样品 S1 2.5 mL，加入混合对照品溶液(5-HMF、丹参素、绿原酸、咖啡酸、毛蕊异黄酮苷、毛蕊花糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 C、迷迭香酸、丹酚酸 B 和芒柄花黄素质量浓度分别为 12.00、15.24、11.30、2.59、8.68、2.10、2.50、6.51、5.52、49.20、2.07  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 2.5 mL，甲醇定容至 25 mL 量瓶，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，5-HMF、丹参素、绿原酸、咖啡酸、毛蕊异黄酮苷、毛蕊花糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 C、迷迭香酸、丹酚酸 B 和芒柄花黄素平均加样回收率分别为 101.4%、97.8%、99.3%、101.5%、98.5%、96.3%、96.9%、95.3%、96.0%、95.4%、97.8%，RSD 分别为 2.2%、1.6%、2.3%、1.5%、2.0%、1.8%、1.1%、2.2%、1.3%、1.9%、2.1%。

**2.5.7 样品含量测定** 取 12 批样品，每批样品按“2.2.2”项下方法平行制备 3 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算上述 11 个成分含量，结果见表 3。

表 3 各成分含量测定结果(n=3)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents

编号 (No.)	含量(content)/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )										
	5-HMF	丹参素 (salvianic acid A)	绿原酸 (chlorogenic acid)	咖啡酸 (caffeic acid)	毛蕊异黄酮苷 (calycosin-7-glucoside)	毛蕊花糖苷 (acteoside)	异绿原酸 B (isochlorogenic acid B)	异绿原酸 C (isochlorogenic acid C)	迷迭香酸 (rosmarinic acid)	丹酚酸 B (salvianolic acid B)	芒柄花黄素 (formononetin)
S1	43.40	227.85	121.13	12.37	44.57	18.36	11.04	42.82	43.29	755.22	3.88
S2	45.03	250.83	134.99	13.72	51.04	20.71	14.33	50.54	49.53	800.16	4.44
S3	59.39	231.82	134.11	13.36	45.09	18.56	12.28	44.85	50.45	888.30	3.36
S4	65.01	231.98	165.10	18.17	56.74	18.08	12.53	52.31	59.41	1 208.50	3.49
S5	59.58	236.56	124.75	11.93	44.51	16.20	12.53	53.27	52.74	901.86	3.85
S6	59.38	239.16	135.81	13.36	43.46	18.87	12.31	47.82	51.08	911.26	3.42
S7	60.50	242.53	135.72	11.87	42.80	17.54	14.73	56.58	54.23	989.13	3.40
S8	62.87	225.21	135.12	12.43	47.77	12.17	9.01	40.15	48.08	991.80	2.90
S9	62.44	219.43	144.73	16.23	46.94	12.13	10.54	50.47	53.09	1029.80	2.47
S10	65.70	228.06	164.78	17.70	56.86	15.03	11.03	51.04	60.29	1205.50	3.36
S11	64.90	274.70	119.00	16.44	56.63	10.01	8.21	57.39	59.58	1091.40	3.36
S12	60.53	248.95	142.02	13.70	43.51	18.54	14.28	56.55	54.44	943.98	3.50
平均值(average)	59.06	238.09	138.11	14.27	48.33	16.35	11.90	50.31	53.02	976.41	3.45
RSD/%	12	6.3	11	16	12	20	17	11	9.6	14	14

### 3 讨论

#### 3.1 检测指标的选择

二地消渴合剂方中熟地、生地、黄芪为君药,山药、麦冬、五味子、天花粉共为臣药,茯苓、炒白术、茵陈为佐药,丹参、郁金为使药。现代药理研究表明,黄芪中的黄酮类成分(如毛蕊异黄酮苷、芒柄花黄素)能够改善血管内皮细胞损伤,而血管内皮细胞损伤是糖尿病-肾病患者血管病变发展中的关键环节,提示该类成分可能是治疗糖尿病-肾病的潜在物质<sup>[8-9]</sup>;苯乙醇苷类成分如毛蕊花糖苷是地黄中的主要成分之一<sup>[10]</sup>,具有广泛的药理活性,如抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡以及肾功能保护作用<sup>[11-12]</sup>;茵陈中主要含有的有机酸类成分(如绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 C、异绿原酸 B),具有明显的抗菌消炎作用且水提液中含量较高<sup>[13]</sup>;丹参中的丹酚酸类成分含量较高(如丹酚酸 B、丹参素、迷迭香酸)且水溶性较好<sup>[14]</sup>,能够显著抑制糖尿病-肾病模型小鼠的机体氧化应激反应和肾脏纤维化,减轻肾间系膜增生和肾小管间质损伤,起到改善糖尿病-肾病的作用<sup>[15-16]</sup>;5-HMF 在二地消渴合剂中含量较高,同时存在于熟地、五味子等多味药中,具有抗氧化<sup>[17]</sup>、降血糖<sup>[18]</sup>等生物活性。基于成分的含量和活性研究考虑,本研究选择 5-HMF、丹参素、绿原酸、咖啡酸、毛蕊异黄酮苷、毛蕊花糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 C、迷迭香酸、丹酚酸 B、芒柄花黄素共 11 个成分为二地消渴合剂的指标性成分。地黄中梓醇和地黄苷 D 在紫外区为末端吸收,难以检测,故未选作指标成分。

#### 3.2 色谱条件优化

**3.2.1 检测波长的选择** 课题组前期使用 PDA 检测器在 210~400 nm 范围内对各成分进行波长扫描,异绿原酸 B、异绿原酸 C、绿原酸和咖啡酸在 326 nm,5-HMF 在 285 nm,丹酚酸 B 在 287 nm,丹参素在 280 nm,迷迭香酸和毛蕊花糖苷在 329 nm,毛蕊异黄酮苷和芒柄花黄素在 250 nm 处有最大吸收,通过对比不同检测波长下的谱图,结果显示在 285 nm 处 11 个成分均有较大吸收,基线平稳且杂质干扰峰较少,故作为检测波长。

**3.2.2 流动相的选择** 考察了不同流动相体系(乙腈-0.1% 磷酸、甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 甲酸)对色谱检测的影响,结果显示,有机相采用乙腈时,相较于甲醇,出峰数量多且色谱图基线较为平稳;水相采用含磷酸溶液时,相较于含甲酸溶液时,

丹酚酸 B、迷迭香酸、异绿原酸 C 和异绿原酸 B 几个有效成分的分度度更好。

**3.2.3 色谱柱的选择** 二地消渴合剂中结构相似的成分较多,部分成分难以分离。本试验考察了不同色谱柱(喆分 Acutfex PW-C<sub>18</sub>、Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>、Waters sunfire-C<sub>18</sub>)的分离效果,发现选用喆分 Acutfex PW-C<sub>18</sub> 色谱柱时峰形尖锐且对称性好,保留时间相近的迷迭香酸和异绿原酸 C 色谱峰可以得到有效分离。

#### 3.3 质量差异评价

指纹图谱相似度评价结果均 > 0.960,表明各批次样品物质基础组成较稳定。化学计量学分析将 12 批样品聚为 3 类,PCA 得分图与 CA 结果一致,其中 PCA 得到的 4 个主成分可代表样品的大部分信息,OPLS-DA 得出 5-HMF、丹酚酸 B 和绿原酸可能是区分二地消渴合剂的差异性质量标志物,可加强对这 3 个关键成分的考察。11 个指标成分含量测定结果的 RSD 在 6.3%~20.3%,表明各批次间二地消渴合剂的质量存在一定的差异性,可能与原饮片产地加工、制剂的制备工艺、存储时间等因素有关<sup>[19]</sup>,有待深入考察。

#### 3.4 小结

本研究建立了二地消渴合剂的 HPLC 指纹图谱,并对其中的 5-HMF、丹参素、绿原酸、咖啡酸、毛蕊异黄酮苷、毛蕊花糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 C、迷迭香酸、丹酚酸 B 和芒柄花黄素共 11 个成分进行了含量测定方法研究,该方法准确度高且重复性强,可用于二地消渴合剂的质量控制。结合化学计量学分析,通过指纹图谱相似度评价、CA、PCA 及 OPLS-DA 综合评价了不同批次二地消渴合剂的成分特征、含量差异及差异来源,可据此对二地消渴合剂指纹图谱共有模式进行长期稳定性考察,完善其质量标准,推动制剂制备工艺的“均一化”,从而保证临床用药的有效性和安全性。

#### 参考文献

- [1] 中华医学会肾脏病学分会专家组. 糖尿病肾脏疾病临床诊疗中国指南[J]. 中华肾脏病杂志, 2021, 37(3): 255  
Expert Group of Nephrology Branch of Chinese Medical Association. Chinese guidelines for clinical diagnosis and treatment of diabetes and kidney disease[J]. *Chin J Nephrol*, 2021, 37(3): 255
- [2] 中华医学会肾脏病学分会专家组. 终末期糖尿病肾脏病替代治疗的中国指南[J]. 中华肾脏病杂志, 2022, 38(1): 62

- Expert Group of Nephrology Branch of Chinese Medical Association. Chinese guidelines for renal replacement therapy for end-stage diabetes nephropathy[J]. *Chin J Nephrol*, 2022, 38(1): 62
- [3] American Diabetes Association. Microvascular complications and foot care: standards of medical care in diabetes - 2021[J]. *Diabet Care*, 2021, 44(1): 151
- [4] ZHANG L, LONG J, JIANG W, *et al.* Trends in chronic kidney disease in China[J]. *N Engl J Med*, 2016, 375(9): 905
- [5] 孙嘉兴, 田瑞娜, 周悦欣, 等. 益气养阴清热法治疗糖尿病肾脏病早期蛋白尿研究进展[J]. *河南中医*, 2022, 42(12): 1921
- SUN JX, TIAN RN, ZHOU YX, *et al.* Research progress of the treatment of proteinuria in early stage of diabetic kidney disease by replenishing Qi and nourishing Yin and clearing heat[J]. *Henan Tradit Chin Med*, 2022, 42(12): 1921
- [6] 李圆圆, 王雪宁, 孙嘉兴, 等. 基于热邪病机分期论治糖尿病肾病探析[J]. *湖南中医杂志*, 2023, 39(2): 112
- LI YY, WANG XN, SUN JX, *et al.* Analysis of treating diabetes nephropathy based on stages of pathogenesis of heat pathogen[J]. *Hunan J Tradit Chin Med*, 2023, 39(2): 112
- [7] 李圆圆, 安晓飞. 二地消渴方治疗 2 型糖尿病肾病早期蛋白尿的临床观察[J]. *实用中医内科杂志*, 2024, 38(7): 41
- LI YY, AN XF. Clinical observation on the treatment of proteinuria in the early stage of type 2 diabetic kidney disease by Erdi Xiaoke formula[J]. *J Pract Tradit Chin Intern Med*, 2024, 38(7): 41
- [8] 李秀丽, 宋瑞霞, 余静, 等. 四种黄芪黄酮类化合物单体对血管内皮细胞功能的保护作用[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2011, 37(4): 1
- LI XL, SONG RX, YU J, *et al.* Protective effects of four kinds of flavonoids of *Astragalus membranaceus* on the endothelial function[J]. *J Lanzhou Univ (Med Sci)*, 2011, 37(4): 1
- [9] 梁连生, 余静, 宋瑞霞, 等. 甘肃黄芪黄酮对 Ang II 致内皮细胞凋亡的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2006(12): 1505
- LIANG LS, YU J, SONG RX, *et al.* Protective effect of astragalus flavone of Gansu on endothelial cells apoptosis induced by angiotensin II in culture[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2006(12): 1505
- [10] 陈金鹏, 张克霞, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展[J]. *中草药*, 2021, 52(6): 1772
- CHEN JP, ZHANG KX, LIU Y, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological actions of *Rehmannia glutinosa*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(6): 1772
- [11] 李博, 段修芳, 王晓丽. 毛蕊花糖苷对类风湿关节炎小鼠骨侵蚀及 JNK/ERK 通路的影响[J]. *现代免疫学*, 2023, 43(6): 514
- LI B, DUAN XF, WANG XL. Impacts of verbascoside on bone erosion and JNK/ERK pathway in rheumatoid arthritis mice[J]. *Curr Immunol*, 2023, 43(6): 514
- [12] 郑帅, 杨敏. 毛蕊花糖苷治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. *医学综述*, 2018, 24(16): 3232
- ZHENG S, YANG M. Research progress of verbascoside in the treatment of diabetic nephropathy[J]. *Med Recapit*, 2018, 24(16): 3232
- [13] 黄丽平, 许远航, 邓敏贞, 等. 茵陈的化学成分、药理作用机制与临床应用研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(4): 676
- HUANG LP, XU YH, DENG MZ, *et al.* Research progress on chemical constituents, pharmacological mechanism and clinical application of *Artemisiae Scopariae Herba*[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2021, 33(4): 676
- [14] 纪国力, 周伟, 巴然然, 等. 双标多测法测定丹参配方颗粒中 6 个酚酸类成分[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(8): 1326
- JI GL, ZHOU W, BA RR, *et al.* Determination of six phenolic acids in Danshen formula granules by two reference substances for determination of multiple components method[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(8): 1326
- [15] 王玲, 吴秋枫. 丹参多酚酸对 2 型糖尿病肾病大鼠肾小管间质激活素 A 表达的影响研究[J]. *环球中医药*, 2017, 10(11): 1312
- WANG L, WU QF. Effects of Danshen polyphenolic acid on expression of activin A of kidney tube interstitial in type 2 diabetic nephropathy rats[J]. *Global Tradit Chin Med*, 2017, 10(11): 1312
- [16] 杨冰, 高飞, 刘令今, 等. 丹参多酚酸盐减轻糖尿病肾病小鼠肾纤维化的机制研究[J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38(5): 1018
- YANG B, GAO F, LIU LJ, *et al.* Mechanism of salvianolate for relieving renal fibrosis in diabetic nephropathy mice[J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med*, 2021, 38(5): 1018
- [17] 张建宏. 5-HMF 抗氧化损伤作用及其作用机制的初步探讨[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2009
- ZHANG JH. Studies on Anti-Oxidative Effects and Potential Mechanisms of 5-HMF[D]. Beijing: PLA Academy of Military Science, 2009
- [18] 张欣, 廖祥伟, 吴松, 等. 5-羟甲基-2-呋喃甲醛衍生物的合成及降血糖活性评价[J]. *中国药物化学杂志*, 2012, 22(5): 349
- ZHANG X, LIAO XW, WU S, *et al.* Synthesis and hypoglycemic activity of 5-hydroxymethyl-2-furfural derivatives[J]. *Chin J Med Chem*, 2012, 22(5): 349
- [19] 张佳, 杨怀瑾, 马丽霞, 等. 中药品质传递过程评价技术与方法研究进展[J]. *中草药*, 2021, 52(15): 4711
- ZHANG J, YANG HJ, MA LX, *et al.* Research progress on evaluation technology and method of quality delivery process of traditional Chinese medicine[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(15): 4711

(本文于 2024 年 3 月 6 日收到)