

# 复方肾苏Ⅱ的 HPLC 指纹图谱及化学成分鉴定

窦一田<sup>1</sup>, 瞿晶田<sup>1\*</sup>, 王玉明<sup>2</sup>, 杨洪涛<sup>1</sup>, 林燕<sup>1</sup>

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300381; 2. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193)

**[摘要]** 目的:建立复方肾苏Ⅱ(肾苏Ⅱ)HPLC 指纹图谱并对其化学成分进行分析,为肾苏Ⅱ质量评价与药效物质基础研究提供依据。方法:采用 Waters Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)进行检测,以乙腈-水(0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)为流动相,进行梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 280 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。测定 10 批肾苏Ⅱ样品,利用中药色谱相似度评价系统建立肾苏Ⅱ HPLC 指纹图谱,并通过对照品对共有峰进行指认;应用 UPLC-ESI-MS/MS 技术对肾苏Ⅱ样品中的化学成分进行鉴别。结果:建立了肾苏Ⅱ成分指纹图谱共有模式,显示 15 个共有峰,各峰分离度良好,各批次间共有峰相对保留时间 RSD 均 < 1.3%,样品间相似度均 > 0.9,指认黄芩苷为特征峰。鉴定出肾苏Ⅱ样品中 26 个化学成分,分别为阿魏酸,汉黄芩素,毛蕊异黄酮,千层纸素,白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷,5,7-二羟基-2'-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷,5,7,2',5'-四羟基-8,6'-二甲氧基黄酮,白杨素-6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷,刍黄芩素Ⅱ,三羟基-单甲氧基黄酮,三羟基-二甲氧基黄酮,芒柄花素,5,7,8-三羟基黄酮,黄芩素,去甲汉黄芩素,黄芩苷,黄芩苷异构体,5,7,8-三羟基-6-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷,白杨素,千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷,汉黄芩苷,汉黄芪素,二羟基-二甲氧基黄酮,熊竹素,三羟基-三甲氧基黄酮,黄芩黄酮Ⅱ。结论:该指纹图谱具有良好的精密度、重复性、稳定性,各共有峰间分离度高,可用于肾苏Ⅱ的质量评价;该研究为肾苏Ⅱ物质基础的研究提供基础。

**[关键词]** 复方肾苏Ⅱ; 高效液相色谱; 指纹图谱; 化学成分; 质量控制

**[中图分类号]** R284.1; R282.6; R243 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)20-0068-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180807

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180125.1557.007.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-26 10:38

## HPLC Fingerprint Analysis and Chemical Component Analysis of Traditional Chinese Medicine Compound Shensu II

DOU Yi-tian<sup>1</sup>, QU Jing-tian<sup>1\*</sup>, WANG Yu-ming<sup>2</sup>, YANG Hong-tao<sup>1</sup>, LIN Yan<sup>1</sup>

(1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300381, China;  
2. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of traditional Chinese medicine (TCM) compound Shensu II (Shensu II) and analyze its chemical components for its quality control and medicinal substance study. **Method:** Waters Symmetry C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase for gradient elution. The detective wave length was 280 nm; the column temperature was set at 30 ℃; the injection volume was 10 μL; and the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. 10 batches of Shensu II samples were detected; their HPLC fingerprint was established by using Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM, and common peaks were identified through controls. UPLC-ESI-MS/MS was used to analyze the chemical components. **Result:** Fingerprints of 10 batches of Shensu II were established and 15 common peaks were identified. The peaks were well separated, and the relative retention time of

**[收稿日期]** 20170711(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年科学基金项目(81403333,81603648);国家自然科学基金面上项目(81373609)

**[第一作者]** 窦一田, 博士, 主治医师, 从事慢性肾脏病中医、中西医结合临床及基础研究, E-mail: hezar1745@163.com

**[通信作者]** \* 瞿晶田, 硕士, 主管药师, 从事中药临床药学及基础研究, E-mail: qvjingtian@sohu.com

common peaks in each batch had RSD of < 1.3% respectively; the similarity was more than 0.9 among different samples. Baicalin was identified as the characteristic peak, and 26 chemical components were identified as follows: ferulic acid, wogonin, calycosin, oroxylin A, chrysin-6-C-arabinose-8-C-glucoside, 5, 7-dyhydroxy-2'-methoxy flavone-7-O-glucuronide, 5, 7, 2', 5'-tetrahydroxy-8, 6'-dimethoxyflavanone, chrysin-6-C-glucose-8-C-arabinoside, tenaxin II, trihydroxy-monomethoxy flavone, trihydroxy-dimethoxyflavone, formononetin, 5, 7, 8-trihydroxyflavone, baicalein, norwogonin, baicalin, baicalin isomer, 5, 7, 8-trihydroxy-6-methoxyflavone-7-O-glucuronide, chrysin, qroxylin A-7-O-glucuronide, wogonoside, astragaln, dyhydroxy-dimethoxyflavone, kumatakenin, trihydroxy-trihydroxyflavone, and skullcapflavone II. **Conclusion:** The method can be used for the quality control of Shensu II with good precision, high accuracy and reproducibility, providing basis for further studies on therapeutic efficacy of Shensu II.

[Key words] compound Shensu II; HPLC; fingerprint; chemical component; quality control

复方肾苏 II (简称肾苏 II) 系天津中医药大学第一附属医院肾病科依托国家中医药管理局中医肾病学重点学科、重点专科建设及“曹式丽全国名老中医药专家传承工作室”所构建之“辛通畅络法慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 防治体系”的重要复方载体,方用柴胡、黄芩、泽兰、水蛭、黄芪、当归、女贞子、细辛等,具辛通畅络,养脏疏导之功效。业已证实,肾苏 II 基于调节免疫应答、延缓硬化进程、改善脂质代谢、抗氧化应激等途径<sup>[1-4]</sup>,有效抑制慢性肾脏疾病病变进展,具有较高的临床应用前景与科学研究价值。然而,在既往辛通畅络法系列研究过程中,相关复方质量控制与药效物质基础阐释仍属空白,成为制约肾苏 II 乃至辛通畅络法 CKD 防治体系序贯研究开展的瓶颈问题之一。中药指纹图谱作为目前中药药材及复方制剂质量控制的重要方法,可对中药材乃至中药复方进行整体性化学表征,借助指纹图谱所具有的整体性特征,能够较为完整、直观地阐释中药材与中药复方所含化学组分之种类与含量,成为对方剂开展有效质量控制的重要依据。同时,为阐释中药材与中药复方药效物质基础提供重要线索。本实验研究即基于中药指

纹图谱技术拟开展对辛通畅络法复方肾苏 II 化学成分的数量、种类进行控制,为实现从宏观层面肾苏 II 的质量控制提供参考,并为辛通畅络法药效物质基础阐释研究的开展提供前期基础。

### 1 材料

Agilent1200LC 系列高效液相色谱系统 (G1315C XL DAD 检测器,柱温箱,自动进样器,美国 Agilent 公司),Acquity 型 UPLC 液相色谱仪,Xevo G2 Q-Tof/MS 型质谱仪,UPLC HSS C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) (美国 Waters 公司)。3-18k 型离心机 (美国 Sigma 公司);DZTW 型电子调温电热套,PTHW 型电热套,KDM 型电热套 (上海新诺仪器设备有限公司);JA3102 型电子天平 (上海海康公司)。

乙腈 (色谱纯, Sigma 公司),其他试剂均为分析纯,试验用水为超纯水。黄芩苷对照品 (Aladdin, 批号 21967-41-9, 纯度 95%)。药材来源见表 1,药品鉴定人王中华副主任药师,各批次药材均符合 2015 年版《中国药典》规定。将上述药材,按照柴胡 12 g,黄芩 1 g,黄芪 3 g,当归 1 g,烫水蛭 1 g 比例,制备 10 批肾苏 II 样品 (编号 S1 ~ S10)。

表 1 肾苏 II 中药材来源

Table 1 Resources of medicinal materials of Shensu II

药名	产地与公司	批号
柴胡	安国路路通中药饮片有限公司	150822, 1509166, 1512014, 1602022, 1603027, 1604019, 1606031, 1609009, 1611025, 1612106
黄芩	广州至信药业有限公司	150501, 150502, 150701, 150801, 151201, 160301, 160401, 160801, 160901, 161001
泽兰	安国美津中药材有限公司	150101, 150601, 150801, 151001, 150813, 151002, 160201, 160601, 160628, 161101
烫水蛭	安国伊康药业有限公司	140101, 140602, 140903, 140502, 150502, 150704, 151005, 151106, 160703, 161204
黄芪	安徽协和成药业饮片有限公司	150901, 151014, 150912, 151201, 151116, 160101, 160301, 160401, 160203, 160304
当归	安国美津中药材有限公司	151201, 160101, 160301, 160401, 160501, 160502, 160601, 160801, 161001, 161201

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品

10.00 mg, 置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.2 供试品溶液制备** 取肾苏Ⅱ样品 8.7 g 称定质量,放入 250 mL 圆底烧瓶中,加纯净水 70 mL,浸泡 30 min。加热至沸腾后,煎煮 1 h,药液过 9 层纱布并转移至烧杯中;药渣加纯净水 70 mL,继续煎煮 1 h(重复煎煮 1 次药渣),以上药液放凉转入 250 mL 量瓶中定容;取定容后药液 2 mL 离心 10 min ( $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ),取上清液,加纯净水 4 mL,50% 甲醇稀释至 10 mL,进样前用  $0.45\mu\text{m}$  滤膜滤过,取续滤液进样分析。

**2.3 HPLC 分析条件** Waters Symmetry  $\text{C}_{18}$  色谱柱 ( $4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm}, 5\mu\text{m}$ ),流动相乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱(0~3 min,0%~2% B;3~5 min,2%~10% B;5~8 min,10%~12% B;8~30 min,12%~25% B;30~40 min,25% B;40~45 min,25%~55% B;45~50 min,55%~95% B;50~54 min,95% B;54~57 min,95%~0% B;57~60 min,0% B),流速  $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,检测波长 280 nm,柱温  $30\text{ }^\circ\text{C}$ ,进样量  $10\mu\text{L}$ 。

**2.4 UPLC-Q-TOF-MS 分析条件** 色谱条件: ACQUITY UPLC HSS  $\text{C}_{18}$  色谱柱 ( $2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}, 1.7\mu\text{m}$ ),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min,2%~6% B;5~10 min,6%~13% B;10~15 min,13%~15% B;15~20 min,15%~20% B;20~25 min,20%~28% B;25~30 min,28%~40% B;30~35 min,40%~85% B;35~40 min,85% B;40~42 min,85%~2% B;42~50 min,2% B),流速  $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温  $40\text{ }^\circ\text{C}$ ,进样量  $5\mu\text{L}$ 。

质谱条件:采用电喷雾电离源(ESI源),在正离子电离模式下进行质谱检测分析。使用高纯  $\text{N}_2$  作为辅助喷雾电离与脱溶剂气体,干燥气流速  $10\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , $\text{N}_2$  温度  $350\text{ }^\circ\text{C}$ ,雾化气气压 310 kPa,脱溶剂氮气流速  $600\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ,锥孔反吹氮气  $50\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ 。毛细管电离电压 2.1 kV,四极杆扫描范围  $m/z\ 50\sim 1\,000$ 。

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 精密度的考察** 吸取供试品溶液  $10\mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,以 9 号峰(黄芩苷)作为参照,分析共有峰的相对保留时间及相对峰面积,考察仪器精密度,结果相对保留时间 RSD 均  $<0.6\%$ ,相对峰面积 RSD 均  $<4.9\%$ 。

**2.5.2 稳定性试验** 取供试品溶液  $10\mu\text{L}$ ,分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样 6 次。以 9 号峰(黄芩苷)作为参照,分析共有峰的相对保留时间及相对峰面积,

考察 24 h 内样品的稳定性,结果相对保留时间 RSD 均  $<0.7\%$ ,相对峰面积 RSD 均  $<6.8\%$ 。

**2.5.3 重复性试验** 取样品 6 份,制备供试品溶液,依法进样分析,以 9 号峰(黄芩苷)作为参照,分析共有峰的相对保留时间及相对峰面积,考察肾苏Ⅱ复方 HPLC-UV 指纹图谱方法的重复性,结果相对保留时间 RSD 均  $<1.0\%$ ,相对峰面积 RSD 均  $<13.0\%$ 。

**2.6 指纹图谱的建立及相似度计算** 取肾苏Ⅱ S1~S10,分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定,记录色谱图。对 10 批样品数据进行分析,采用多点校正方式(时间窗宽度为 0.1 min),平均数法生成指纹图谱和对照指纹图谱。分析 10 批肾苏Ⅱ HPLC 色谱图,黄芩作为肾苏Ⅱ君药,其所含黄芩苷亦是肾苏Ⅱ主要活性成分之一,且 9 号峰与相邻峰分离较好,其含量较高且比较稳定。因此,以 9 号峰(黄芩苷)为参照峰(S 峰),记录各色谱峰保留时间、峰面积及同一图谱中 S 峰保留时间、峰面积,计算 10 批肾苏Ⅱ 方指纹图谱中各色谱峰的相对保留时间与相对峰面积,确定肾苏Ⅱ方中 15 个色谱峰为其共有峰。各色谱峰达到分离。见图 1,2。

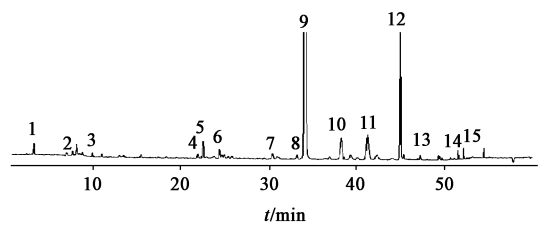


图1 肾苏Ⅱ HPLC 色谱

Fig.1 HPLC chromatogram of compound Shensu II

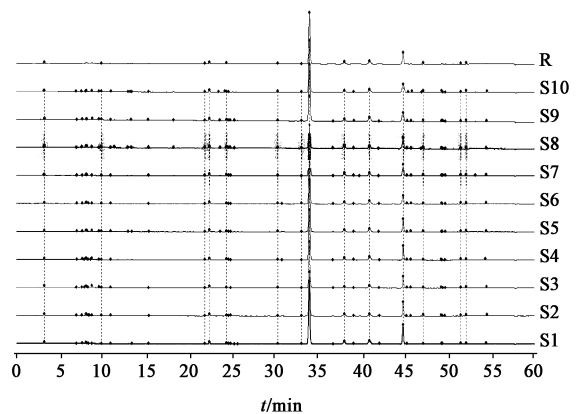


图2 10批肾苏Ⅱ复方 HPLC 指纹谱及对照指纹谱(R)

Fig.2 10 batches of HPLC fingerprint and control fingerprint about Shensu II (R)

**2.7 指纹图谱及共有峰的标定** 以建立之色谱条

件,对 10 批样品进行测定,得到肾苏Ⅱ高效液相指纹图谱,见图 2;肾苏Ⅱ所含成分色谱峰于 60 min 内洗脱完全,15 个共有峰,对黄芩苷进行归属,并生成对照指纹图谱。

**2.8 相似度评价** 基于《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A》,对 10 样本指纹图谱进行匹配,相似度在 0.998~1。见表 2~4。

**2.9 UPLC-Q-TOF-MS 成分鉴别** 为进一步明确肾苏Ⅱ的化学成分,运用 UPLC-ESI-MS/MS 对指纹图谱色谱峰指认。同时,采用正、负离子模式进行扫描,通过质谱中分子离子峰和碎片离子峰的分子量匹配,结合紫外吸收光谱特征,相关文献以及对照品对照,鉴定肾苏Ⅱ指纹图谱中 26 个色谱峰的化学成分。见图 3,表 5。

表 2 10 批肾苏Ⅱ HPLC 指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 2 10 batches of HPLC fingerprint common peak relative retention time about Shensu Ⅱ

批号	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15
S1	0.095	0.224	0.289	0.643	0.659	0.716	0.893	0.973	1.121	1.208	1.319	1.386	1.513	1.533
S2	0.094	0.220	0.288	0.642	0.657	0.713	0.89	0.973	1.122	1.208	1.318	1.383	1.508	1.527
S3	0.095	0.232	0.290	0.643	0.659	0.716	0.893	0.974	1.120	1.206	1.319	1.386	1.513	1.533
S4	0.095	0.224	0.289	0.645	0.660	0.717	0.893	0.974	1.121	1.211	1.319	1.384	1.511	1.530
S5	0.095	0.224	0.290	0.643	0.658	0.715	0.892	0.974	1.119	1.206	1.320	1.388	1.515	1.535
S6	0.095	0.225	0.291	0.645	0.660	0.717	0.893	0.974	1.119	1.204	1.321	1.392	1.520	1.539
S7	0.096	0.225	0.291	0.643	0.659	0.716	0.892	0.974	1.119	1.205	1.322	1.392	1.519	1.538
S8	0.096	0.224	0.290	0.644	0.659	0.717	0.892	0.974	1.119	1.205	1.321	1.391	1.518	1.538
S9	0.094	0.225	0.291	0.644	0.659	0.716	0.890	0.974	1.118	1.204	1.323	1.396	1.524	1.543
S10	0.095	0.223	0.291	0.644	0.659	0.717	0.890	0.975	1.117	1.202	1.320	1.395	1.523	1.542

注:9 号峰均为 1.000(表 3 同)。

表 3 10 批肾苏Ⅱ方 HPLC 指纹图谱共有峰相对峰面积(以黄芩苷峰作为参照)

Table 3 10 batches of HPLC fingerprint common peak relative peak area about Shensu Ⅱ (reference by baicalin peak)

批号	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15
S1	0.012	0.006	0.004	0.008	0.030	0.016	0.013	0.010	0.066	0.091	0.238	0.005	0.008	0.011
S2	0.015	0.006	0.005	0.007	0.035	0.017	0.013	0.009	0.065	0.073	0.235	0.017	0.008	0.011
S3	0.012	0.005	0.005	0.008	0.031	0.015	0.013	0.008	0.052	0.089	0.199	0.011	0.009	0.012
S4	0.013	0.005	0.004	0.008	0.032	0.016	0.013	0.009	0.065	0.110	0.207	0.010	0.008	0.011
S5	0.013	0.005	0.004	0.007	0.029	0.015	0.013	0.010	0.062	0.102	0.206	0.011	0.009	0.011
S6	0.012	0.006	0.004	0.008	0.035	0.017	0.013	0.010	0.065	0.091	0.198	0.012	0.008	0.012
S7	0.012	0.005	0.004	0.008	0.030	0.016	0.012	0.006	0.075	0.095	0.223	0.012	0.009	0.011
S8	0.013	0.006	0.004	0.010	0.031	0.016	0.015	0.009	0.073	0.082	0.221	0.012	0.008	0.011
S9	0.015	0.006	0.004	0.009	0.032	0.018	0.017	0.009	0.064	0.090	0.221	0.015	0.007	0.010
S10	0.014	0.006	0.006	0.008	0.032	0.017	0.016	0.009	0.057	0.089	0.247	0.018	0.006	0.012

表 4 10 批肾苏 II 方 HPLC 指纹图谱相似度

Table 4 10 batches of HPLC fingerprint similarity calculation results about Shensu II

批号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1	1	0.999	0.999	0.999	0.999	1	1	0.999	1	1
S2	1	1	0.999	0.999	0.999	0.999	1	1	0.998	1	1
S3	0.999	0.999	1	0.999	1	1	0.999	0.999	0.999	0.999	1
S4	0.999	0.999	0.999	1	1	1	1	0.999	1	0.999	1
S5	0.999	0.999	1	1	1	1	1	1	0.999	0.999	1
S6	0.999	0.999	1	1	1	1	1	0.999	0.999	0.998	1
S7	1	1	0.999	1	1	1	1	1	0.999	0.999	1
S8	1	1	0.999	0.999	1	0.999	1	1	0.999	0.999	1
S9	0.999	0.998	0.999	1	0.999	0.999	0.999	0.999	1	0.999	0.999
S10	1	1	0.999	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999	1	0.999
对照	1	1	1	1	1	1	1	1	0.999	0.999	1

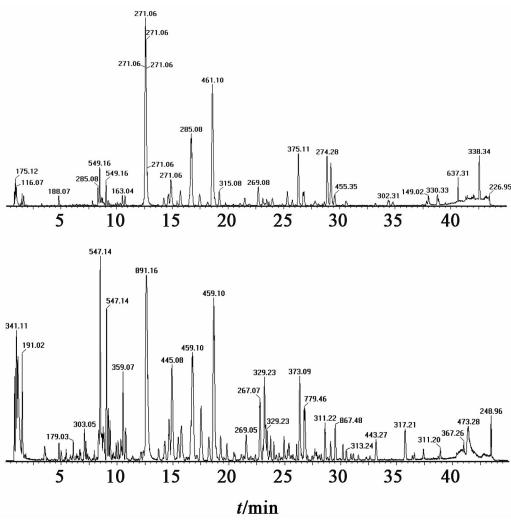


图 3 肾苏 II UPLC-Q-TOF-MS 正、负离子 BPI  
Fig. 3 BPI of UPLC-Q-TOF-MS about Shensu II

### 3 讨论

中药指纹图谱作为一种对中药复杂物质体系进行检测的常用分析手段,可将中药化学成分群的特征信息运用相关仪器检测结果予以综合表达,并用于中药质量评价、质量控制与新药研究。本研究采用 HPLC 方法建立了肾苏 II 指纹图谱,得到不同 10 批次肾苏 II 指纹图谱,并建立辛通畅络法肾苏 II 成分指纹图谱共有模式,显示 15 个共有峰,为肾苏 II 质量评价提供依据。同时,采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析肾苏 II 中存在之化学成分,根据正、负离子模式下准分子离子峰,结合各个化合物的裂解规律,确定肾苏 II 26 个化合物,为序贯辛通畅络法药效物质基础阐释研究的开展奠定了前期基础。

#### 3.1 色谱条件的选择与优化 选择正确合适的

色谱条件,应首先考虑目标成分是否能在液相色谱中有足够多的特征峰数,即主要化学成分得以有效分离。采用适当进样量,至少使最小成分特征峰的峰面积达到 4 位数。在洗脱方法上,应先考虑等度洗脱,如不符合,应尽量选用线性梯度洗脱。对于色谱柱的选择,应尽可能使用通用色谱柱,而避免选择特殊色谱柱。

同时,肾苏 II 中含有多种化学物质,如黄芩苷、汉黄芪素、尿苷、各类黄酮及其衍生物、柴胡皂苷等,成分较为复杂,确定较为理想的洗脱条件是相关研究开展的关键。肾苏 II 含多种不同极性物质,在保证良好专属性与重复性前提下,本次研究同时进行同等条件下的等度洗脱和梯度洗脱。结果提示,梯度洗脱中肾苏 II 中成分分离效果更好,因此选择使用梯度洗脱。

HPLC 常用乙腈、甲醇。其中,甲醇毒性较低,而乙腈溶剂则强度高、黏度较低。首次实验以甲醇作为有机改性剂,所得结果表明,甲醇体系无法得到令人满意的分离效果。其后,改用乙腈,经过调试获得相对理想分离效果。此外,本次研究中,分别采用乙腈-水、乙腈-甲醇、甲醇-水等不同浓度、不同比例等度和梯度条件下进行试验,考察峰型等因素,发现酸性条件下,指纹图谱拥有较令人满意峰型。其中,乙腈-水(0.1%  $H_3PO_4$ )进行线性梯度洗脱时,肾苏 II 中各组分可较好分离。比较 230, 254, 280, 320 nm 等不同波长,考察各波长处基线色谱峰数目,峰型及信号强度等因素,确定测定波长为 280 nm 条件为最佳。同时,比较色谱柱柱温,分别采用 25, 30, 35  $^{\circ}C$  进行测定分析。试验结果提示,随

表 5 UPLC-Q-TOF-MS 化合物归属

Table 5 Identification of compounds using UPLC-Q-TOF-MS

No.	<i>t</i> /min	化合物	相对分子质量	准分子离子峰	扫描方式	MS/MS ( <i>m/z</i> )
1	6.85	阿魏酸	194.050 1	193.052 4	ESI <sup>-</sup>	178,149,121
2	8.34	汉黄芩素	284.060 6	285.077 5	ESI <sup>+</sup>	270
3	8.34	千层纸素	284.076 3	285.077 5	ESI <sup>+</sup>	270
4	8.35	毛蕊异黄酮	284.060 6	283.059 1	ESI <sup>-</sup>	268,239
5	8.48	白杨素-6- <i>C</i> -阿拉伯糖-8- <i>C</i> -葡萄糖苷	548.160 8	549.163 9	ESI <sup>+</sup>	375,393,411,495
6	8.72	5,7-二羟基-2'-甲氧基黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	462.087 7	463.088 9	ESI <sup>+</sup>	-
7	8.9	5,7,2',5'-四羟基-8,6'-二甲氧基黄酮	346.076 7	347.072 2	ESI <sup>+</sup>	332,317,314
8	9.05	白杨素-6- <i>C</i> -葡萄糖-8- <i>C</i> -阿拉伯糖苷	548.154 3	549.162 1	ESI <sup>+</sup>	393,411,495,375,513,000
9	10.75	鞣黄芩素 II	300.071 2	301.072	ESI <sup>+</sup>	286
10	10.75	三羟基-单甲氧基黄酮	300.071 2	301.072	ESI <sup>+</sup>	286
11	12.35	三羟基-二甲氧基黄酮	330.081 8	331.087 1	ESI <sup>+</sup>	301
12	12.49	芒柄花素	268.065 7	267.063 7	ESI <sup>-</sup>	252,223
13	12.56	5,7,8-三羟基黄酮	270.060 6	271.062 2	ESI <sup>+</sup>	253,241
14	12.6	黄芩素	270.071 2	271.061 7	ESI <sup>+</sup>	253,241
15	12.6	去甲汉黄芩素	270.060 6	271.061 7	ESI <sup>+</sup>	271,253,241,225
16	15.42	黄芩苷	446.092 7	447.096 7	ESI <sup>+</sup>	271,253
17	15.42	黄芩苷异构体	446.092 7	447.096 7	ESI <sup>+</sup>	271
18	15.42	5,7,8-三羟基-6-甲氧基黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	446.103 3	447.096 7	ESI <sup>+</sup>	286
19	16.57	白杨素	254.065 7	255.068 5	ESI <sup>+</sup>	-
20	18.6	千层纸素 A-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	460.108 4	461.103 3	ESI <sup>+</sup>	285,270
21	18.6	汉黄芩苷	460.108 4	461.103 3	ESI <sup>+</sup>	285,270
22	18.67	汉黄芩素	284.076 3	283.763 0	ESI <sup>-</sup>	270,183
23	19.22	二羟基-二甲氧基黄酮	314.086 9	315.084 0	ESI <sup>+</sup>	282,285
24	19.27	熊竹素	314.071 2	313.068 5	ESI <sup>-</sup>	271
25	25.21	三羟基-三甲氧基黄酮	344.097 4	345.096 8	ESI <sup>+</sup>	330
26	26.32	黄芩黄酮 II	374.108 0	375.108 3	ESI <sup>+</sup>	375,360,345,342,327

着温度升高,20 min 后各峰保留时间有前移;柱温 30 ℃时,分离度最好,基线平稳,故选择 30 ℃柱温。

**3.2 指纹图谱相似度评价** 本试验采用 HPLC 对肾苏 II 进行分析。10 批次肾苏 II HPLC 指纹图谱不可避免地存在一定差别,但均可找到相同色谱特征峰,拥有近似指纹图谱概貌,且通过单次进样便可获得大量色谱特征峰,分离分析效率高,各色谱峰保留时间亦较为稳定,具有较好的稳定性与可控性。值得注意的是,尽管 10 批次肾苏 II 中各保留成分基本一致,但仍有少数成分具有一定差异性,如 2 号峰 RSD 过大。提示不同批次肾苏 II 的差异主要来源于该物质。本次试验已确定 2 号峰为尿苷,其含量测定对肾苏 II 质量鉴定具有重要参考价值。同时,9 号峰峰面积最大,分离度较高,可作为肾苏 II 质量控制和质量评价的重要指标。

**3.3 提取方法的选择** 根据肾苏 II 预估成分及测定普遍采用的提取方法,确定以纯净水为溶剂进行提取,并比较超声提取和加热回流提取两种提取方法结果。证实,通过上述 2 种提取方法得到的 HPLC 指纹图谱大体无差别,各色谱峰强度无大差异。分别采用浸泡 30 min,不浸泡 30 min,以及提取时间为 30 min 两次,40 min 两次,50 min 两次。结果证实,在浸泡 30 min,提取时间为 30 min 两次的条件下,肾苏 II 各组分可获得较好分离。

**3.4 展望** 足细胞病 (podocytopathies) 作为 21 世纪初提出的新兴医学概念与肾脏病研究热点,系以肾小球足细胞数量和 (或) 密度减少基底膜增厚、基质成分改变、足突融合等为特征性病理改变的一类肾小球疾病<sup>[5-6]</sup>,临床涵盖微小病变肾病 (minimal change disease, MCD),膜性肾病 (membranous

nephropathy, MN), 局灶节段性肾小球硬化 (focal segmental glomerulus sclerosis, FSGS) 及糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 等多种常见原发、继发性慢性肾小球疾病<sup>[7]</sup>。然而, 由于常规治疗方案的乏善可陈, 加之较为明显的药物不良反应, 临床亟待寻找相关疾病安全、有效的综合治疗方案。目前, 中医药防治由于其确切的临床疗效与良好的卫生经济学综合成本-效益, 已为肾脏病专业领域所广泛关注, 具有良好应用前景与科研价值。肾苏Ⅱ即是全国名老中医药专家曹式丽教授“辛通畅络”学术思想的重要中药复方载体, 对于前述足细胞病相关病种的临床防治具有较好疗效, 并可有效阻抑足细胞病变进展<sup>[8]</sup>。然而, 其深层作用机制与有效成分筛选仍有待进一步阐释。近年提出的“组分中药”概念, 基于中药药效成分理论, 针对复方功效、主治得出精简中药化学组分, 具有成分明确、机制清楚、疗效吻合的优点, 并满足现代科学对药物有效性、安全性、稳定性的要求, 是最终实现中医药现代化、国际化的重要途径<sup>[9]</sup>, 亦为辛通畅络法系列研究的序贯开展提供了新的研究领域与空间。

同时, 中药材作为天然产物, 由其基于中医基本理论组成的中药复方中某些成分因为配伍的原因, 具有非常不稳定之特点, 且中药材产地、储存运输条件等因素导致同一种药材的质量参差不齐。上述不稳定的因素的存在, 为中药指纹图谱的构建造成诸多技术难题。因此, 中药材规范化种植, 以及为中药的运输、储存、炮制等环节制定科学规范的标准亦将成为辛通畅络法载体复方乃至现代中医药发展的重点方向之一。

[参考文献]

- [1] 窦一田, 高先楼, 支勇. 肾苏Ⅱ对局灶节段性肾小球硬化的保护作用[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(7): 1376-1377.
- [2] 梁栋. 肾苏Ⅱ对局灶节段性肾小球硬化患者氧化低密度脂蛋白、血脂及血肌酐的影响[J]. 山西中医学院学报, 2014, 15(2): 38-40.
- [3] 窦一田, 高先楼, 曹式丽. 肾苏Ⅱ对系膜增生性肾炎模型大鼠肾病变及白细胞介素-6的影响[J]. 中医杂志, 2011, 52(13): 1131-1134.
- [4] 支勇, 窦一田, 曹式丽. 辛通畅络法对系膜增生性肾炎模型大鼠肾组织白介素表达的调节要求[J]. 陕西中医, 2014, 35(5): 613-615.
- [5] Pollak M R. Inherited podocytopathies FSGS and nephrotic syndrome from a genetic viewpoint[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(12): 3016-3023.
- [6] Barisoni L, Mundel P. Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases[J]. Am J Nephrol, 2003, 23(5): 353-360.
- [7] Salmon AH, Neal CR, Harper SJ. New aspects of glomerular filtration barrier structure and function: five layers (at least) not three [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009, 18(3): 197-205.
- [8] 尚懿纯, 曹式丽, 杨洪涛, 等. 肾苏Ⅱ方对局灶节段性肾小球硬化大鼠 Notch-PI3K/PKB 通路串话及足细胞 EMT 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(12): 5271-5276.
- [9] 崔向微, 张贵君. 组分中药与中药现代化[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1290-1291.

[责任编辑 顾雪竹]