

基于多成分定量的清热消癥方质量评价及标志性成分筛选[△]

陈佳惠^{1*}, 罗 琼¹, 蔚丽君¹, 王跃武², 李 君², 刘成东², 郝佳佳², 牛利文^{3#}(1. 包头市第三医院药剂科, 内蒙古包头 014040; 2. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 3. 呼和浩特市中医蒙医院中医肾病科, 呼和浩特 010110)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)06-0740-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.06.08



摘要 目的 综合评价清热消癥方的质量, 并筛选影响该方质量的潜在标志性成分。方法 采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)技术测定清热消癥方中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、金丝桃苷、异槲皮苷、黄芩苷、黄芩素、隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A、丹参酮Ⅰ、洋川芎内酯A、阿魏酸的含量; 以上述成分含量为变量, 采用OriginPro 2024及SIMCA 14.1软件进行聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA), 并以变量重要性投影(VIP)值>1且P<0.05为标准筛选影响清热消癥方质量的标志性成分; 运用熵权-逼近理想解排序(TOPSIS)法和灰色关联分析(GCA)法对20批样品的质量进行综合评价。结果 上述11种成分的含量分别为7.993~72.866、4.542~31.228、727.666~1 901.884、496.846~1 293.279、1 995.501~6 779.150、54.500~241.280、150.302~304.339、79.698~189.206、257.118~682.418、5.498~21.687、7.524~26.935 μg/g。CA、PCA、OPLS-DA结果显示, 20批样品聚为两类, Q1、Q3、Q4、Q7~Q9、Q12、Q15、Q16聚为一类, 其余聚为一类; 阿魏酸、丹参酮Ⅱ_A、黄芩苷、隐丹参酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷的VIP值>1且P<0.05。熵权-TOPSIS法和GCA法结果显示, 欧氏贴进度最优解和相对关联度排前11位的样品包括Q2、Q5、Q6、Q10、Q11、Q13、Q14、Q17~Q20。结论 所建HPLC-MS/MS法快速准确、灵敏度高, 结合化学模式识别分析及熵权-TOPSIS法、GCA法可用于综合评价清热消癥方的质量。阿魏酸、丹参酮Ⅱ_A、黄芩苷、隐丹参酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷可能为影响该方质量的标志性成分; Q17等11批样品的整体质量较优。

关键词 清热消癥方; 化学模式识别分析; 熵权-逼近理想解排序法; 灰色关联分析法; 标志性成分

Quality evaluation of Heat-clearing and symptom-relieving formula based on multi-component quantification and screening of marker components

CHEN Jiahui¹, LUO Qiong¹, WEI Lijun¹, WANG Yuewu², LI Jun², LIU Chengdong², HAO Jiajia², NIU Liwen³
(1. Dept. of Pharmacy, Baotou Third Hospital, Inner Mongolia Baotou 014040, China; 2. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 3. Dept. of Traditional Chinese Medicine Nephrology, Hohhot Traditional Chinese and Mongolian Medicine Hospital, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To systematically evaluate the quality of the Heat-clearing and symptom-relieving formula and screen potential marker components that influence the quality of the formula. **METHODS** The contents of 11 components (calycosin-7-O-β-D-glucoside, ononin, hyperoside, isoquercitrin, baicalin, baicalein, cryptotanshinone, tanshinone II_A, tanshinone I, senkyunolide A, ferulic acid) in the Heat-clearing and symptom-relieving formula were determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Using the contents of the aforementioned components as variables, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were conducted using OriginPro 2024 software and SIMCA 14.1 software; marker components affecting the quality of the Heat-clearing and symptom-relieving formula were then screened based on the criteria of variable importance in the projection (VIP) value>1 and P<0.05. The comprehensive evaluation of 20 batches of samples was carried out using the entropy weight-technique for order preference by similarity to ideal solution (TOPSIS) and grey correlation analysis (GCA) methods. **RESULTS** The contents of the above 11 components were 7.993-72.866, 4.542-31.228, 727.666-1 901.884, 496.846-1 293.279, 1 995.501-6 779.150, 54.500-241.280, 150.302-304.339, 79.698-189.206, 257.118-682.418, 5.498-21.687, 7.524-26.935 μg/g. CA, PCA and OPLS-DA results showed that 20 batches of samples were grouped into 2 categories. Q1, Q3, Q4, Q7-Q9, Q12, Q15, Q16 were grouped into one category, and the rest were grouped into another category; VIP values of ferulic acid, tanshinone II_A, baicalin, cryptotanshinone, calycosin-7-O-β-D-glucoside and ononin were all greater than 1 (P<0.05). Both the entropy weight-TOPSIS and GCA methods showed that the samples ranked in the top 11 according to the euclidean distance and relative correlation degree were Q2, Q5, Q6, Q10, Q11, Q13, Q14, Q17-Q20. **CONCLUSIONS** The established HPLC-MS/MS method is rapid, accurate and highly sensitive. Combined with chemical pattern recognition

[△] 基金项目 内蒙古自治区自然科学基金项目(No.2025MS08135)

* 第一作者 主管药师, 硕士研究生。研究方向: 中药质量控制方法研究。E-mail: 752296653@qq.com

通信作者 主任医师。研究方向: 中医药质量评价。E-mail: 714456564@qq.com

analysis, entropy weight-TOPSIS and GCA methods, this method can be used to evaluate the quality of the Heat-clearing and symptom-relieving formula. Ferulic acid, tanshinone II_A, baicalin, cryptotanshinone, calycosin-7-O-β-D-glucoside and ononin may be the marker components that affect the quality of this formula. The overall quality of 11 batches of the Heat-clearing and symptom-relieving formula, including Q17, is relatively superior.

KEYWORDS Heat-clearing and symptom-relieving formula; chemical pattern recognition analysis; entropy weight-TOPSIS method; grey correlation analysis method; marker component

清热消癥方根据国医大师吕仁和教授“肾络癥瘕学说”及王耀献教授“内热致癥”理论化裁而成,由黄芪、黄蜀葵花、黄芩、水蛭、土鳖虫、丹参、当归组成,具有益气活血、清热解毒、通络消癥之功效。中医认为,“热邪”伏于肾络、结为癥瘕是糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)的核心病机,宜以清热消癥为治法,故清热消癥方被广泛用于DKD的临床治疗。研究表明,在西医常规治疗的基础上联用清热消癥方,可有效降低DKD患者的尿蛋白水平,延缓肾功能进展,显著改善临床症状,提高患者生活质量^[1]。现代药理学表明,方中黄芪可调节糖脂代谢、保护肾小球基底膜^[2];其活性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷为2025年版《中国药典》(一部)规定的黄芪定量指标之一,该成分与刺芒柄花苷均为黄芪发挥免疫调节作用的潜在质量标志物^[3]。黄蜀葵花能降低尿微量白蛋白水平,改善足细胞损伤^[4];金丝桃苷为其质控成分,可与异槲皮苷共同发挥抗炎、抗氧化作用^[5]。黄芩可通过抗炎、抗凋亡等途径来缓解肾损伤^[6],其主要有效成分黄芩苷、黄芩素具有抗炎解热活性^[7]。丹参可改善肾脏血流、抑制炎症与氧化应激^[8],其质控成分丹参酮类(隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A)是该药发挥活血化瘀功效的关键物质基础^[9]。当归可通过抗炎、降低尿蛋白及改善足细胞损伤来延缓DKD病情^[10],以阿魏酸和洋川芎内酯 A 为主要质控指标;阿魏酸是2025年版《中国药典》(一部)规定的质量评定标志性成分,具有良好的清除氧自由基、抑制脂质过氧化的能力;洋川芎内酯 A 作为当归挥发油中主要且稳定的苯醌类成分,其含量与药材品质和药效密切相关^[11-12]。水蛭和土鳖虫可抗凝血、改善微循环、抗氧化应激,从而缓解DKD血瘀状态^[13]。诸药合用,可从多靶点、多途径发挥保护肾脏、延缓DKD进展的综合作用。

目前,关于清热消癥方的研究主要以药理作用为主^[14],尚缺乏针对质量控制的相关探索。中药复方的质量控制是保障其临床疗效、用药安全及制剂稳定的关键,因此开展相关质控研究具有重要意义。然而,单一的多成分含量测定尚不足以全面反映中药复方的质量差异,识别影响不同批次样品质量的标志性成分,是提升复方整体质量控制水平的核心环节。高效液相色谱-串联质谱(high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)技术具有灵敏度高、专属性强、分析周期短等特点,已被广泛用于中药复方多组分的定量分析^[15]。化学模式识别分析可对复杂数据进行降维、识别、分类处理,使多变量信息得以整

合,能有效克服传统制剂质量评价过程中多维信息分析困难的问题^[16]。熵权-逼近理想解排序(technique for order preference by similarity to ideal solution, TOPSIS)法能够将多指标变量转化为单个综合变量,从而降低分析过程中不同类型指标的干扰,使分析结果更为客观、科学^[17]。灰色关联分析(grey correlation analysis, GCA)法可通过分析数据间的关联程度来确定主导因素,从而使质量评价结果更为直观^[18]。基于此,本研究采用HPLC-MS/MS技术测定清热消癥方中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、金丝桃苷、异槲皮苷、黄芩苷、黄芩素、隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、阿魏酸、洋川芎内酯 A 的含量,结合化学模式识别分析及熵权-TOPSIS、GCA 法对20批清热消癥方的质量进行评价及差异分析,筛选潜在质量标志性成分,以期为该方的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括LC-MS/MS 8045型液相色谱-串联三重四级杆质谱仪、AUW120D型十万分之一电子天平(日本Shimadzu公司),BSA224S型万分之一天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号BWC9099-2016,纯度≥98%)购自北方伟业计量集团有限公司;对照品刺芒柄花苷(批号LB097752,纯度≥98%)、金丝桃苷(批号LB095552,纯度≥98%)、异槲皮苷(批号LB096652,纯度≥98%)均购自徕博(上海)生化科技有限公司;对照品黄芩苷(批号BWC9019-2016,纯度≥98%)、黄芩素(批号DSTDH002402,纯度≥98%)均购自成都乐美天医药科技有限公司;对照品隐丹参酮(批号B022652,纯度≥98%)、丹参酮 II_A(批号B023552,纯度≥98%)、丹参酮 I(批号B024252,纯度≥98%)均购自上海起发生物科技有限公司;对照品洋川芎内酯 A(批号LW18050223,纯度≥98%)购自南京良纬生物科技有限公司;对照品阿魏酸(批号110773-201614,纯度≥98%)购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,甲酸为质谱纯,其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。

各组方饮片均购自相关企业,经内蒙古医科大学药学院生药教研室渠弼教授鉴定均为真品(限于篇幅,饮片具体来源信息可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附表1)。采用随机数表法对不同批次、不同产地饮片进行组合,获得20批清热消癥方样品(编号

Q1~Q20;限于篇幅,具体组合信息可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附表2)。

2 方法与结果

2.1 清热消癥方中11种成分的含量测定

2.1.1 清热消癥方散剂粉末的制备

清热消癥方由黄芪40 g、黄蜀葵花30 g、黄芩10 g、水蛭5 g、土鳖虫10 g、丹参50 g、当归15 g组成。为便于实验操作与样品制备,按原处方比例缩小40倍,精密称取黄芪1.000 g、黄蜀葵花0.750 g、黄芩0.250 g、水蛭0.125 g、土鳖虫0.250 g、丹参1.250 g、当归0.375 g,将各饮片分别粉碎,过四号筛,置于研钵中,混匀,即得清热消癥方散剂粉末,备用。

2.1.2 供试品溶液的制备

取“2.1.1”项下清热消癥方散剂粉末,置于50 mL具塞锥形瓶中,加入70%甲醇30 mL,称重,超声(功率250 W,频率90 kHz,温度45℃)处理45 min,冷却至室温;再次称重,用70%甲醇补足失重,再以3 000 r/min离心10 min,取上清液,经0.22 μm微孔滤膜滤过;滤液分别用80%甲醇稀释10、100倍(分别用于阿魏酸和其余成分测定),即得相应供试品溶液,备用。

2.1.3 混合对照品溶液的制备

精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、金丝桃苷、异槲皮苷、黄芩苷、黄芩素、隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A、丹参酮Ⅰ、洋川芎内酯A、阿魏酸对照品适量,置于10 mL具塞容量瓶中,用70%甲醇溶解并定容,得上述11种成分质量浓度分别为582、302、242、247、320、271、446、280、651、500、688 μg/mL的单一对照品母液。精密量取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷、金丝桃苷、异槲皮苷、黄芩素、隐丹参酮、丹参酮Ⅱ_A、丹参酮Ⅰ、洋川芎内酯A对照品母液适量,置于10 mL容量瓶中,用70%甲醇稀释并定容,得质量浓度分别为98.940、57.380、6 050.000、4 446.000、487.800、1 159.600、1 008.000、3 385.200、50.000 ng/mL的混合对照品溶液;精密量取黄芩苷对照品母液适量,置于10 mL容量瓶中,用70%甲醇稀释并定容,得质量浓度为9 600.000 ng/mL的黄芩苷对照品溶液;精密量取阿魏酸对照品母液适量,置于10 mL容量瓶中,用70%甲醇稀释并定容,得质量浓度为550.400 ng/mL的阿魏酸对照品溶液。

2.1.4 空白对照溶液

以70%甲醇为空白对照溶液。

2.1.5 检测条件

(1)色谱条件:以Shim-pack GIST-HP C₁₈(2.1 mm×100 mm, 3 μm)为色谱柱;以甲醇(A)-水(含0.1%甲酸)(B)为流动相进行梯度洗脱(0.01~0.22 min, 15%A→25%A; 0.22~1.10 min, 25%A→38%A; 1.10~2.60 min, 38%A→55%A; 2.60~3.50 min, 55%A→65%A; 3.50~5.00 min, 65%A→70%A; 5.00~5.60 min, 70%A→85%A; 5.60~7.00 min, 85%A→95%A; 7.00~7.50 min, 95%A→15%A);流速为0.25 mL/min;柱温为35℃;进样量为3 μL。

(2)质谱条件:采用电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI),在正负离子模式下以多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式进行分段扫描;喷雾电压为3.80 kV(正离子)、3.50 kV(负离子);雾化气流速为3 L/min;加热气流速为10 L/min;接口温度为300℃;脱溶剂温度为526℃;加热块温度为400℃。各待测成分的质谱定量参数见表1。

表1 各待测成分的质谱定量参数

待测成分	检测模式	母离子m/z	子离子m/z	碰撞能量eV
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	正离子模式	447.2	285.0	17
刺芒柄花苷	正离子模式	431.2	269.1	16
金丝桃苷	负离子模式	463.0	300.0	27
异槲皮苷	负离子模式	463.0	300.0	28
黄芩苷	正离子模式	447.2	271.0	20
黄芩素	正离子模式	271.2	123.0	35
隐丹参酮	正离子模式	297.2	251.1	24
丹参酮Ⅱ _A	正离子模式	295.2	249.1	23
丹参酮Ⅰ	正离子模式	277.2	178.0	41
洋川芎内酯A	正离子模式	193.2	137.2	13
阿魏酸	负离子模式	193.0	134.0	17

2.1.6 专属性试验

分别取“2.1.2”项下供试品溶液(编号Q1)、“2.1.3”项下混合对照品和黄芩苷、阿魏酸对照品溶液,以及“2.1.4”项下空白对照溶液适量,按“2.1.5”项下条件进样测定,记录色谱图(限于篇幅,具体色谱图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图1)。结果显示,毛蕊异黄酮葡萄糖苷为双峰,分离度良好且稳定;其余成分均为单峰,且峰形良好;空白对照溶液对测定无干扰,表明方法专属性良好。

2.1.7 线性关系与定量限、检测限考察

精密量取“2.1.3”项下黄芩苷对照品溶液0.025、0.10、0.20、0.40、0.80、1.00 mL,置于1 mL容量瓶中,用80%甲醇稀释并定容,即得系列黄芩苷对照品溶液;精密量取阿魏酸对照品溶液0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL,置于1 mL容量瓶中,用80%甲醇稀释并定容,即得系列阿魏酸对照品溶液;精密量取“2.1.3”项下其余成分的混合对照品溶液0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL,置于1 mL容量瓶中,用80%甲醇稀释并定容,即得系列混合对照品溶液。取上述系列溶液,按“2.1.5”项下条件进样分析,记录峰面积。以各待测成分质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归。另取“2.1.3”项下各单一对照品母液适量,用70%甲醇稀释,制得各系列质量浓度的标准溶液,按“2.1.5”项下条件进样分析,以信噪比为3时对应样品的质量浓度作为检测限,以信噪比为10时对应样品的质量浓度作为定量限。结果见表2。

2.1.8 精密度试验

分别精密吸取“2.1.3”项下混合对照品和黄芩苷、阿魏酸对照品溶液,按“2.1.5”项下条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,上述11种成分峰面积的RSD为1.17%~2.96%(n=6),表明仪器精密度良好。

表2 各待测成分的线性关系、定量限、检测限考察结果

待测成分	回归方程	r	线性范围/ (ng/mL)	定量限/ (ng/mL)	检测限/ (ng/mL)
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=8.711 \times 10^3 X + 2.535 \times 10^4$	0.999 0	9.894~98.940	0.096	0.032
刺芒柄花苷	$Y=1.184 \times 10^4 X + 2.308 \times 10^4$	0.999 0	5.738~57.380	0.087	0.029
金丝桃苷	$Y=2.606 \times 10^3 X + 5.762 \times 10^3$	0.999 2	605.000~6 050.000	0.545	0.180
异槲皮苷	$Y=3.367 \times 10^3 X + 5.077 \times 10^3$	0.999 0	444.600~4 446.000	0.435	0.145
黄芩苷	$Y=6.671 \times 10^3 X - 3.134 \times 10^4$	0.999 1	240.000~9 600.000	19.503	6.436
黄芩素	$Y=1.867 \times 10^3 X - 2.600 \times 10^4$	0.999 3	48.780~487.800	2.910	0.960
隐丹参酮	$Y=8.375 \times 10^3 X - 2.214 \times 10^5$	0.999 8	115.960~1 159.600	1.427	0.471
丹参酮II _A	$Y=3.128 \times 10^3 X + 7.721 \times 10^4$	0.999 1	100.800~1 008.000	3.702	1.222
丹参酮I	$Y=4.589 \times 10^3 X - 5.897 \times 10^4$	0.999 3	338.520~3 385.200	6.919	2.283
洋川芎内酯A	$Y=3.659 \times 10^3 X + 3.567 \times 10^3$	0.999 6	5.000~50.000	2.232	0.736
阿魏酸	$Y=1.104 \times 10^3 X - 6.505 \times 10^3$	0.999 2	55.040~550.400	1.369	0.452

2.1.9 重复性试验

取样品(编号Q1)散剂粉末,共6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.5”项下条件进样,记录峰面积并根据回归方程计算样品中各成分的含量。结果显示,上述11种成分含量的RSD为0.61%~2.98%(n=6),表明方法重复性良好。

2.1.10 稳定性试验

取“2.1.2”项下供试品溶液(编号Q1),分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1.5”项下条件进样,记录峰面积。结果显示,上述11种成分峰面积的RSD为0.53%~1.99%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.11 加样回收率试验

称取已知成分含量的样品(编号Q1)散剂粉末,共6份,每份约2 g,按质量比1:1加入各对照品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.5”项下条件进样,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,上述11种成分的平均加样回收率为96.14%~106.60%,RSD为2.96%~6.72%(n=6),表明方法准确度良好。

表2 20批样品中11种成分的含量测定结果(n=3, μg/g)

编号	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	刺芒柄花苷	金丝桃苷	异槲皮苷	黄芩苷	黄芩素	隐丹参酮	丹参酮II _A	丹参酮I	洋川芎内酯A	阿魏酸
Q1	46.043	21.441	1 223.051	843.854	3 228.931	139.184	186.087	118.453	261.694	7.537	7.853
Q2	24.766	10.501	1 870.796	1 282.297	4 833.345	229.162	228.362	111.350	512.911	12.580	16.114
Q3	12.938	4.712	1 262.507	865.812	3 201.673	149.368	205.266	109.502	293.542	6.524	7.524
Q4	31.922	14.636	1 106.315	755.056	3 696.106	169.299	174.911	92.021	257.118	15.611	14.294
Q5	53.426	23.834	1 815.411	1 217.047	6 779.150	181.118	302.326	189.206	365.494	16.167	26.935
Q6	68.192	25.250	1 901.884	1 293.279	5 289.160	147.995	295.032	169.890	474.102	16.759	23.589
Q7	22.160	9.820	764.865	519.341	3 736.193	121.014	150.302	79.698	303.474	16.044	14.194
Q8	7.993	5.007	1 429.276	959.564	4 231.360	112.889	203.487	104.190	344.382	16.073	16.421
Q9	25.093	11.611	928.577	627.066	4 003.970	176.784	236.826	125.027	317.239	8.294	14.015
Q10	62.602	22.449	1 832.910	1 240.251	5 008.740	116.576	180.733	120.798	313.447	15.297	22.247
Q11	46.034	19.913	1 693.580	1 138.734	5 358.329	141.852	238.944	136.825	682.418	18.824	20.644
Q12	39.383	17.161	1 015.871	688.632	5 694.220	162.629	259.160	135.266	423.293	12.621	11.357
Q13	46.909	19.926	1 426.174	971.851	6 325.436	173.851	298.029	167.716	422.687	20.210	25.101
Q14	70.897	28.935	1 630.148	1 098.020	6 684.305	159.223	300.653	174.676	372.989	20.027	26.390
Q15	34.513	12.431	727.666	496.846	4 061.392	181.889	161.358	80.177	262.510	15.889	19.338
Q16	12.015	4.542	1 871.627	1 261.923	1 995.501	54.500	208.145	121.421	321.140	5.498	10.820
Q17	72.866	31.228	1 890.934	1 278.342	6 651.500	169.529	304.339	175.059	465.823	21.687	25.244
Q18	49.269	21.999	1 151.750	778.191	6 447.403	147.368	254.971	128.630	355.081	20.792	23.860
Q19	60.242	22.161	1 863.903	1 270.883	6 303.787	241.280	300.379	163.377	397.607	21.517	24.226
Q20	26.799	11.791	1 217.968	835.022	3 632.214	108.073	274.262	115.311	653.717	19.525	20.973

2.1.12 样品含量测定

取20批样品(编号Q1~Q20)散剂粉末,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.5”项下条件进样,记录峰面积并根据回归方程计算样品中各成分的含量。每批样品平行检测3次,结果见表2。

2.2 化学模式识别分析

2.2.1 聚类分析

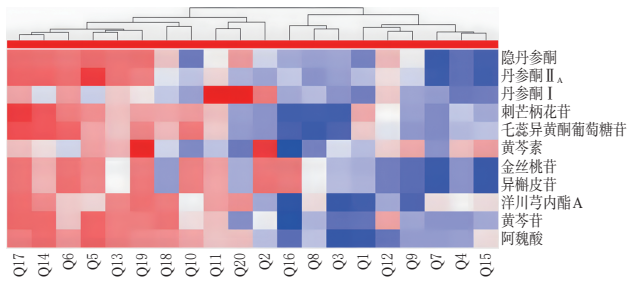
以20批样品中11种成分的平均含量为变量,采用OriginPro 2024软件进行聚类分析(cluster analysis, CA),聚类参数设置为完全连锁法,距离度量参数设置为欧氏距离,回调函数参数设置为聚类热图函数。结果(图1)显示,20批样品可聚为两类,Q1、Q3、Q4、Q7~Q9、Q12、Q15、Q16聚为一类,其余聚为一类,提示各样品的质量存在一定差异。

2.2.2 主成分分析

采用SIMCA 14.1软件对20批样品中11种成分的平均含量进行无监督的主成分分析(principal component analysis, PCA),数据经自动归一化处理得PCA得分图。结果(图2)显示,20批样品可分为两类,分类结果与CA结果基本一致,仅Q20样品在两种分析方法中略有差异,可能与其成分含量介于两类之间、属于过渡型批次有关。

2.2.3 正交偏最小二乘-判别分析

为更好地体现组内差异,本研究构建了有监督的正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)模型。结果(图3)显示,OPLS-DA分类结果与CA结果一致,且分类更为明显。为防止上述模型因过拟合而出现假阳性结果,本研究通过随机排列200次置换检验对OPLS-DA模型进行验证。结果显示,模型Q²均在R²之下,Q²回归线与纵轴的交点小于0,表明该模型有效、无过度拟合。



注:颜色由红至蓝表示各成分平均含量逐渐降低。

图1 20批样品的CA结果

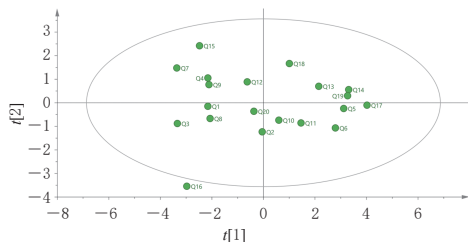


图2 20批样品的PCA得分图

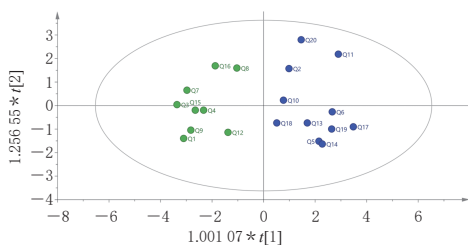


图3 20批样品的OPLS-DA得分图

以变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP)值 >1 且 $P<0.05$ 为标准^[19],筛选影响清热消癥方质量的标志性成分。结果(图4)显示,阿魏酸、丹参酮II_A、黄芩苷、隐丹参酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷对应色谱峰的VIP值均大于1(分别为1.126、1.092、1.085、1.076、1.043、1.040)且 $P<0.05$,推断这6个成分可能是影响清热消癥方质量的标志性成分。

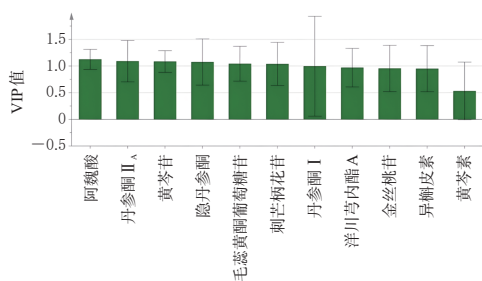


图4 清热消癥方样品中11种成分的VIP值

2.3 熵权-TOPSIS与GCA评价

运用SPSSAU数据分析平台,采用熵权-TOPSIS法和GCA法对20批样品中11种成分含量进行综合评价^[20]。其中,熵权-TOPSIS法分析通过构建初始化、归一化及加权决策矩阵,计算欧氏贴进度及其最优解(C_i),并对 C_i 进行排序(C_i 值越大,表示样品综合质量越优^[21])。结果(表3)显示, C_i 由高到低排名前11位的样品依次为Q17、Q6、Q11、Q19、Q14、Q5、Q13、Q20、Q2、Q18、Q10。

GCA法则通过建立灰色模式识别数据集,按相对关联度(r_i)进行排序(r_i 越大,表示样品质量越好^[21])。结果(表3)显示, r_i 由高到低排名前11位的样品依次为Q17、Q19、Q14、Q5、Q6、Q13、Q11、Q10、Q2、Q18、Q20。可见,两种方法的分析结果基本一致,均提示样品Q2、Q5、Q6、Q10、Q11、Q13、Q14、Q17~Q20样品的综合质量相对较好。此外,熵权-TOPSIS法分析的最大差异为72.1%,GCA法分析的最大差异为54.4%,提示与GCA法相比,熵权-TOPSIS法能更好地区分清热消癥方样品的质量优劣。

表3 20批样品的熵权-TOPSIS法与GCA法分析结果

编号	熵权-TOPSIS法			GCA法		
	欧氏贴进度	C_i 排序	C_i 差异/%	r_i	r_i 排序	r_i 差异/%
Q1	0.322	15	57.5	0.437	16	49.9
Q2	0.524	9	30.8	0.597	8	31.6
Q3	0.226	19	70.1	0.403	19	53.8
Q4	0.278	17	63.3	0.437	15	49.9
Q5	0.642	6	15.2	0.778	4	10.9
Q6	0.721	2	4.8	0.744	5	14.8
Q7	0.211	20	72.1	0.398	20	54.4
Q8	0.326	14	56.9	0.450	14	48.5
Q9	0.290	16	61.7	0.435	18	50.2
Q10	0.504	11	33.4	0.597	8	31.6
Q11	0.711	3	6.1	0.641	7	26.6
Q12	0.436	12	42.4	0.495	12	43.3
Q13	0.619	7	18.2	0.673	6	22.9
Q14	0.659	5	12.9	0.779	3	10.8
Q15	0.266	18	64.9	0.435	17	50.2
Q16	0.345	13	54.4	0.472	13	45.9
Q17	0.757	1	0	0.873	1	0
Q18	0.509	10	32.8	0.596	10	31.7
Q19	0.664	4	12.3	0.805	2	7.8
Q20	0.570	8	24.7	0.548	11	37.2

注: C_i 差异=(C_i 最大值-各评价单元 C_i)/ C_i 最大值 $\times 100\%$; r_i 差异=(r_i 最大值-各评价单元 r_i)/ r_i 最大值 $\times 100\%$ 。

3 讨论

3.1 检测条件的优化

本课题组前期对不同流动相[甲醇-水(含0.1%甲酸)、甲醇-水(含0.2%甲酸)]进行了考察。结果显示,当流动相为甲醇-水(含0.1%甲酸)时,各成分色谱峰峰形最优、分离度最好;同时,采用梯度洗脱后能使11种成分在10 min内得到有效分离。在质谱条件考察中,本课题组首先分别在正、负离子模式下对11种成分进行全扫描,确定各成分的检测模式;检测过程中发现,金丝桃苷、异槲皮苷、阿魏酸在负离子模式下的响应更强,其余成分在正离子模式下的响应更强;随后,本课题组通过调整碰撞能量,选择响应更强的碎片离子进行定量分析,最终得到11种成分的质谱定量参数。

3.2 含量测定与化学模式识别结果分析

由含量测定结果可知,20批样品中11种成分的含量差异较大,提示饮片来源、制备工艺存在差异,从而直接影响成方的质量均一性;其中,黄芩苷的含量差异最大(1 995.501~6 779.150 $\mu\text{g/g}$),其可能是导致药效差异

的关键化学基础。为客观、全面地阐明质量差异来源,本研究对11种成分的平均含量进行化学模式识别分析。CA结果显示,20批样品可聚为两类,其中Q2、Q5、Q6、Q10、Q11、Q13、Q14、Q17~Q20聚为一类,表明这些批次样品在化学成分组成上具有相似的特征且与其他批次样品存在明显差异。PCA、OPLS-DA分析进一步证实了CA结果。通过VIP值统计发现,阿魏酸、丹参酮Ⅱ_A、黄芩苷、隐丹参酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷对应色谱峰的VIP均大于1且 $P < 0.05$,提示这6种成分可能是造成清热消癥方质量差异的标志性成分。

3.3 熵权-TOPSIS法、GCA法评价结果分析

熵权-TOPSIS法、GCA法评价结果显示,Q2、Q5、Q6、Q10、Q11、Q13、Q14、Q17~Q20样品的 C_i 、 r_i 值均大于其他批次,上述结果与CA、PCA、OPLS-DA结果一致,提示上述11批样品的整体质量较优。黄芪作为清热消癥方的君药,在配伍中发挥核心药效作用,虽其活性成分含量并非最高,但其原料质量对全方质量的稳定性具有决定性影响,因此本研究对黄芪的原料质量与产地差异进行分析。结果发现,黄芪的产地分布呈现明显规律,在综合质量较优的批次中,甘肃产黄芪(批号为250501、250705281)的出现频率较高;内蒙古产黄芪(批号为25071401)虽在部分优质批次中出现,但其分布与质量优选的关联性不如甘肃产黄芪明确。通过分析黄芪中关键质量标志物毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量发现,甘肃产黄芪中该成分的平均含量普遍高于内蒙古产黄芪。这一发现与学界对黄芪的传统认知高度吻合:甘肃被誉为黄芪的“道地产区”,其所产黄芪以“根条粗壮、豆腥味浓”著称;内蒙古作为黄芪的重要产区,其饮片质量亦属上乘。正如本研究所示,甘肃产黄芪表现出更稳定的质量。上述结果提示,在清热消癥方的质量控制及原料筛选环节中,可优先考虑选用甘肃产黄芪,以提升复方整体质量的稳定性和可控性。

综上所述,本研究所建HPLC-MS/MS法快速准确、灵敏度高,结合化学模式识别分析及熵权-TOPSIS法、GCA法可用于综合评价清热消癥方的质量。阿魏酸、丹参酮Ⅱ_A、黄芩苷、隐丹参酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、刺芒柄花苷可能为影响该方质量的标志性成分;Q17等11批样品的整体质量较优。

参考文献

[1] 王梦迪,刘梦超,赵文景,等.清热消癥方改善糖尿病肾脏病患者蛋白尿及对血清sTNFR1、sTNFR2的影响[J].中华中医药杂志,2022,37(10):6183-6188.

[2] 张佳伟,赵志芬,任相阁,等.基于“治水者必先治气”探讨黄芪活性成分治疗糖尿病肾病的研究进展[J/OL].中华中医药学刊,2025:1-10[2025-10-21]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20250522.1510.058>.

[3] 张梅僮,刘海龙,王瑞琼,等.黄芪化学成分和药理作用及Q-marker预测分析[J].中国新药杂志,2023,32(4):410-419.

[4] 吴薇,刘莹露,万毅刚,等.黄葵胶囊对早期糖尿病肾脏疾病患者胰岛素抵抗和尿微量白蛋白的多靶点治疗作用[J].中国中药杂志,2020,45(23):5797-5803.

[5] 关诗涵,刘畅,颜晓桐,等.黄蜀葵花化学成分、药理活性研究进展及质量标志物的预测分析[J].中国中药杂志,2025,50(4):908-921.

[6] 秦李娜,喻嵘.黄芩-黄连药对及其活性成分治疗糖尿病肾病的作用机制研究进展[J].上海中医药杂志,2024,58(10):89-94.

[7] 李蕊,徐荣荣,张楚涵,等.基于UPLC指纹图谱及多成分含量测定评价不同产地黄芩质量的研究[J].时珍国医国药,2025,36(12):2278-2284.

[8] 王婷婷,张渊.丹参的临床药理研究新进展[J].临床合理用药,2025,18(11):164-167.

[9] 周颖,滕井泉,田乐乐,等.丹参及有效化学成分干预肥胖机制的研究进展[J].中药材,2023,46(11):2890-2894.

[10] 靳贺超,梁胜然,张冠文,等.基于TXNIP/NLRP3/GSDMD信号通路探讨当归补血汤对糖尿病肾病大鼠足细胞焦亡的影响[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(3):49-57.

[11] 马艳春,吴文轩,胡建辉,等.当归的化学成分及药理作用研究进展[J].中医学学报,2022,50(1):111-114.

[12] 刘妍如,唐志书,宋忠兴,等.以药效成分群-活性-功效关联作用筛选当归质量标志物[J].中草药,2021,52(9):2626-2637.

[13] 刘彤,伊桐凝.常用虫类药治疗糖尿病肾病研究进展[J].实用中医内科杂志,2025,39(2):121-124.

[14] 高亚斌,王峥,曹博宁,等.清热消癥方对db/db糖尿病肾脏病小鼠NLRP3/Caspase-1/GSDMD焦亡通路的影响[J].中华中医药杂志,2025,40(1):159-163.

[15] 田萍,马开,张薇,等.UPLC-MS/MS同时测定真武汤中16个成分的含量[J].中药材,2022,45(1):144-148.

[16] 黄思成,康绍建,曹海峰,等.基于指纹图谱及化学模式识别的小儿腹痛草质量评价[J].中药材,2023,46(7):1740-1743.

[17] 赵鑫,李君君,权文越,等.基于熵权TOPSIS评价半夏不同干燥方法对质量的影响[J].中药材,2022,45(2):327-330.

[18] 李力,潘倩雯,刘宏.灰色关联度分析法在中药谱效学研究中的应用[J].中国药房,2018,29(11):1581-1584.

[19] 何小芳,王欣,李及,等.基于15种成分定量结合化学模式识别及TOPSIS分析的三黄片质量评价[J].中草药,2024,55(24):8379-8391.

[20] 王玉霞,武晓玉,夏鹏飞,等.基于熵权TOPSIS模型对经不同方法干燥的苦水玫瑰品质的综合评价[J].中成药,2021,43(5):1241-1248.

[21] 顾志荣,王亚丽,孙宇靖,等.熵权TOPSIS模型在甘肃产当归药材综合质量评价中的应用[J].中药材,2014,37(9):1549-1553.

(收稿日期:2025-12-03 修回日期:2026-03-04)

(编辑:陈宏)