

# 益母草颗粒HPLC指纹图谱及4个指标成分含量研究<sup>△</sup>

朱子聪<sup>1\*</sup>, 边雨<sup>2</sup>, 高陆<sup>2#</sup>, 宋德库<sup>3</sup>, 佟志军<sup>3</sup>(1. 长春中医药大学药学院, 长春 130117; 2. 吉林省现代中药工程研究中心有限公司, 长春 130033; 3. 吉林天力泰药业有限公司, 吉林白山 134400)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)05-0586-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.05.13



**摘要** 目的 建立益母草颗粒的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并对其中盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷4个指标成分进行含量测定。方法 采用Inertsil™ ODS-3色谱柱,以乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱,流速为1.0 mL/min,检测波长为280 nm,柱温为25 ℃,进样量为5 μL。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立10批益母草颗粒的HPLC指纹图谱并分析其相似度,通过与对照品图谱比对进行共有峰指认。使用SPSS 25.0软件和SIMCA 13.0软件进行聚类分析和主成分分析;同时,采用HPLC法测定益母草颗粒中盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷4个指标成分的含量。结果 建立了10批益母草颗粒的HPLC指纹图谱,共匹配出16个共有峰,并指认出6号峰为盐酸益母草碱、13号峰为阿魏酸、14号峰为芦丁、16号峰为金丝桃苷,10批样品的相似度均大于0.970。通过聚类分析和主成分分析,10批样品均被分为4类,分类结果一致。样品中盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷的含量分别为122.10~138.82、9.33~10.45、14.12~18.95、5.87~8.06 μg/g。结论 建立的益母草颗粒HPLC指纹图谱及4个指标成分含量测定方法简便易行、准确度高、重复性好,可为益母草颗粒的质量评价提供参考。

**关键词** 益母草颗粒;指纹图谱;聚类分析;主成分分析;含量测定;盐酸益母草碱;阿魏酸;芦丁;金丝桃苷

## Study on HPLC fingerprint of *Leonurus japonicus* granules and the contents of 4 index components

ZHU Zicong<sup>1</sup>, BIAN Yu<sup>2</sup>, GAO Lu<sup>2</sup>, SONG Deku<sup>3</sup>, TONG Zhijun<sup>3</sup> (1. College of Pharmacy, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China; 2. Jilin Modern TCM Engineering and Research Center Co., Ltd., Changchun 130033, China; 3. Jilin Tianlitai Pharmaceutical Co., Ltd., Jilin Baishan 134400, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To establish HPLC fingerprint of *Leonurus japonicus* granules, and to determine the contents of 4 index components such as leonurine hydrochloride, ferulic acid, rutin, hyperoside. **METHODS** The determination was performed on Inertsil™ ODS-3 column with mobile phase consisted of acetonitrile (A)-0.1% formic acid solution (B) in the form of gradient elution; the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 280 nm, the column temperature was 25 ℃, and the sample size was 5 μL. *Similarity Evaluation System of Chromatogram Fingerprint of TCM* (2012 edition) was used for establishing the HPLC fingerprints of 10 batches of *L. japonicus* granules and analyzing their similarities. By comparing with HPLC fingerprints of reference substance, the common peaks were identified. SPSS 25.0 and SIMCA 13.0 software were used for cluster analysis and principal component analysis; the above HPLC method was used for the content determination of 4 index components in *L. japonicus* granules such as leonurine hydrochloride, ferulic acid, rutin, hyperoside. **RESULTS** HPLC fingerprints of 10 batches of *L. japonicus* granules were established, and 16 common peaks were matched, and 4 peaks identified were leonurine hydrochloride (peak 6), ferulic acid (peak 13), rutin (peak 14), hyperoside (peak 16); the similarities of 10 batches of samples were all higher than 0.970. The 10 batches of samples could be divided into four categories by cluster analysis and principal component analysis; the classification results were consistent. The contents of leonurine hydrochloride, ferulic acid, rutin and hyperoside were 122.10-138.82 μg/g, 9.33-10.45 μg/g, 14.12-18.95 μg/g, 5.87-8.06 μg/g, respectively. **CONCLUSIONS** Established HPLC fingerprint of *L. japonicus* granules and the method for the content determination of 4 index components are simple and easy to operate, and have high precision and good repeatability, which provide reference for the quality evaluation of *L. japonicus* granules.

**KEYWORDS** *Leonurus japonicus* granules; fingerprint; cluster analysis; principle component analysis; content determination; leonurine hydrochloride; ferulic acid; rutin; hyperoside

益母草颗粒为2020年版《中国药典》(一部)收载品种,由益母草单味中药组成,具有活血调经的功能,临床

△ 基金项目:吉林省科技发展计划项目(No.20190304106YY)

\* 硕士研究生。研究方向:中药制剂新技术与新药开发。E-mail: 2224236796@qq.com

# 通信作者:主任药师,博士生导师,博士。研究方向:中药制剂新技术与新药开发。E-mail: bxgl@163.com

上常用于治疗血瘀所导致的月经不调、产后恶露不绝等症<sup>[1]</sup>。现代研究表明,益母草中主要含有生物碱类、黄酮类、苯丙素类、二萜类、多糖等化学成分<sup>[2-5]</sup>。其中,盐酸益母草碱为生物碱类成分,具有抗血小板聚集的作用;芦丁、金丝桃苷为黄酮类成分,具有抗心肌缺血、促进心肌收缩、抗菌及抗氧化等作用<sup>[6]</sup>;阿魏酸为苯丙素类成

分,具有抗氧化、降血脂、抗血栓及抗心肌缺血等作用<sup>[7]</sup>。近年来的研究主要集中于益母草颗粒中盐酸水苏碱和盐酸益母草碱的含量测定,未见其他指标成分的含量测定和指纹图谱研究<sup>[8-10]</sup>,难以科学、全面地对该药的质量进行控制。而指纹图谱及多指标成分检测能够提供丰富的化学成分信息,全面呈现药材及其制剂的质量优劣,从而保证其内在品质的稳定性和均一性<sup>[11-12]</sup>。鉴于此,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法建立10批益母草颗粒的指纹图谱,并结合聚类分析和主成分分析(principal component analysis,PCA)2种化学模式识别分析方法,同时通过建立HPLC法测定其中盐酸益母草碱、芦丁、金丝桃苷和阿魏酸4个指标成分的含量,旨在为全面评价和控制益母草颗粒的质量提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

Ultimate 3000型HPLC仪(配备四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器和Chromleon 7色谱工作站)购买于美国Thermo Fisher Scientific公司;MS205DU型电子天平购买于梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH-S114型恒温水浴锅购买于金坛市华龙实验仪器厂;SD25-12DT型超声清洗机购买于宁波新芝生物科技股份有限公司。

### 1.2 药品与试剂

10批益母草颗粒(记为S1~S10,批号分别为180201、180202、180401、180601、180602、180603、180604、190301、190302、190303,规格为每袋15 g)均由吉林天力泰药业有限公司提供;盐酸益母草碱(批号111823-201704,纯度94.3%)、阿魏酸(批号110773-201614,纯度99%)、芦丁(批号100080-201409,纯度91.9%)、金丝桃苷(批号111521-201507,纯度94.3%)对照品均购买于中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用Inertsil™ ODS-3色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),以乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~20 min,5% A→15% A;20~40 min,15% A→20% A;40~65 min,20% A),流速为1.0 mL/min,柱温为25 ℃,检测波长为280 nm,进样量为5 μL。

### 2.2 混合对照品溶液的制备

称取盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷对照品各适量,用50%甲醇溶解并稀释制成质量浓度依次为276、164、236、272 μg/mL的单一对照品溶液。精密量取上述单一对照品溶液各适量,置于同一10 mL量瓶中,

用50%甲醇定容,摇匀,制得盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷质量浓度依次为55、10、100、20 μg/mL的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取益母草颗粒4.0 g,精密称定,置于150 mL具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,密封,称定质量后超声(功率600 W,频率40 kHz)处理40 min,冷却至室温,再次称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,收集续滤液,即得。

### 2.4 指纹图谱的建立及分析

2.4.1 精密度试验 取益母草颗粒(S6)适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图,以盐酸益母草碱为参照峰(S)计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果,各共有峰相对峰面积和相对保留时间的RSD均小于1.00%(n=6),表明该仪器的精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取益母草颗粒(S6)适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在室温(10~30 ℃)下分别放置0、2、4、8、12、18、24 h,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以盐酸益母草碱为参照峰(S)计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果,各共有峰相对峰面积和相对保留时间的RSD均小于2.00%(n=7),表明供试品溶液在室温下放置24 h稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取益母草颗粒(S6)适量,共称取6份,分别按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以盐酸益母草碱为参照峰(S)计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果,各共有峰相对峰面积和相对保留时间的RSD均小于2.00%(n=6),表明该方法的重复性良好。

2.4.4 指纹图谱的建立及共有峰的指认 取10批益母草颗粒各适量,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液。取上述供试品溶液和“2.2”项下混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样测定,记录色谱图。将10批益母草颗粒的色谱图导入《中药指纹图谱相似度评价系统(2012版)》中,以样品S6的色谱图为参照图谱,设置时间窗宽度为0.10 min,以全谱峰形式进行自动匹配生成叠加指纹图谱,并采用中位数法生成对照指纹图谱R。通过与混合对照品溶液图谱比对,对共有峰进行指认。结果显示,10批益母草颗粒的色谱图中共匹配出16个共有峰。通过与混合对照品溶液图谱比对,指认出其中4个共有峰,依次为盐酸益母草碱(6号峰)、阿魏酸(13号峰)、芦丁(14号峰)、金丝桃苷(16号峰)。10批益母草颗粒的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱R见图1,混合对照品溶液的HPLC图见图2。

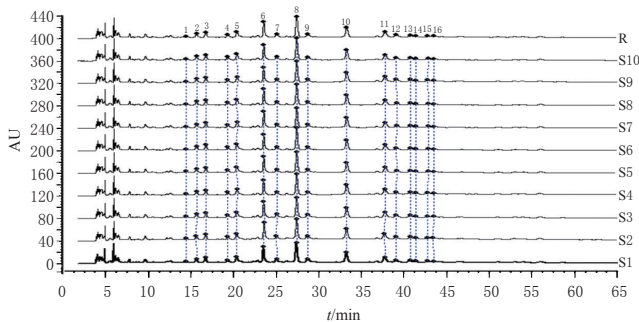
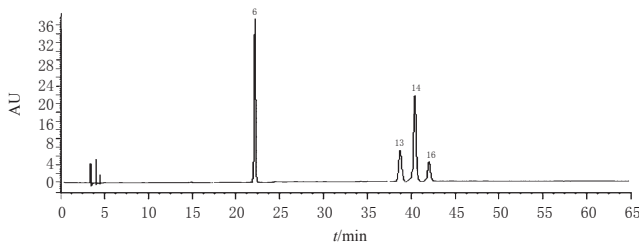


图1 10批益母草颗粒的HPLC叠加指纹图谱及对照指纹图谱R



6: 盐酸益母草碱; 13: 阿魏酸; 14: 芦丁; 16: 金丝桃苷

图2 混合对照品溶液的HPLC图

2.4.5 相似度分析 以对照指纹图谱R为参照图谱,通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》软件分析10批益母草颗粒的相似度。结果显示,10批益母草颗粒的相似度均大于0.970,表明不同批次益母草颗粒的相似度良好、质量较稳定,结果见表1。

表1 10批益母草颗粒的相似度评价结果

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱R
S1	1.000	1.000	0.991	0.999	0.999	0.986	0.998	0.966	0.996	0.982	0.998
S2	1.000	1.000	0.993	0.998	0.998	0.989	0.997	0.971	0.995	0.985	0.999
S3	0.991	0.993	1.000	0.986	0.986	0.999	0.983	0.991	0.977	0.998	0.997
S4	0.999	0.998	0.986	1.000	1.000	0.980	0.999	0.956	0.999	0.974	0.995
S5	0.999	0.998	0.986	1.000	1.000	0.980	0.999	0.956	0.999	0.975	0.996
S6	0.986	0.989	0.999	0.980	0.980	1.000	0.976	0.995	0.970	1.000	0.994
S7	0.998	0.997	0.983	0.999	0.999	0.976	1.000	0.951	0.999	0.971	0.994
S8	0.966	0.971	0.991	0.956	0.956	0.995	0.951	1.000	0.943	0.997	0.979
S9	0.996	0.995	0.977	0.999	0.999	0.970	0.999	0.943	1.000	0.964	0.991
S10	0.982	0.985	0.998	0.974	0.975	1.000	0.971	0.997	0.964	1.000	0.991
对照指纹图谱R	0.998	0.999	0.997	0.995	0.996	0.994	0.994	0.979	0.991	0.991	1.000

## 2.5 聚类分析

以10批益母草颗粒的16个共有峰峰面积为变量,通过SPSS 25.0软件运用组间对比法对10批益母草颗粒进行系统聚类分析,以平方欧氏距离为标尺计算样品的相似程度。结果显示,当平方欧氏距离为10时,10批益母草颗粒样品可被划分为4类:第1类为S4~S6、S8~S10;第2类为S1、S2;第3类为S3;第4类为S7。10批益母草颗粒的聚类分析树状图见图3。

## 2.6 PCA

以10批益母草颗粒的16个共有峰峰面积为变量,采用SPSS 25.0软件进行PCA,PCA得分图见图4。模型建立结果显示,本研究提取出3个主成分:第1主成分的

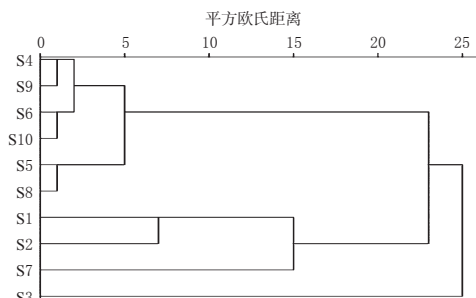


图3 10批益母草颗粒样品的聚类分析树状图

特征值为9.630、方差贡献率为60.185%,第2主成分的特征值为3.026、方差贡献率为18.912%,第3主成分的特征值为1.903、方差贡献率为11.891%。3个主成分的累计方差总贡献率为90.987%,表明3个主成分的提取涵盖了样品共有成分的大部分信息,代表性良好,可用于益母草颗粒的质量评价。PCA结果显示,10批样品被划分为4类:第1类为S4~S6、S8~S10;第2类为S1、S2;第3类为S3;第4类为S7。该结果与聚类分析结果一致,表明不同批次的样品可以被区分开。

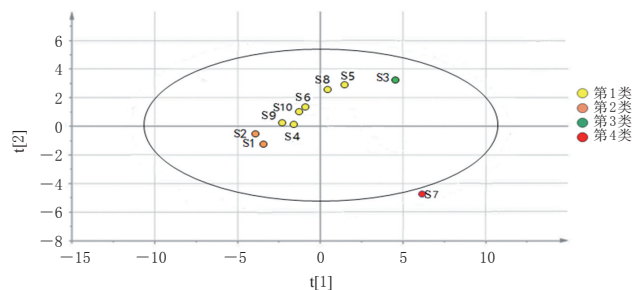
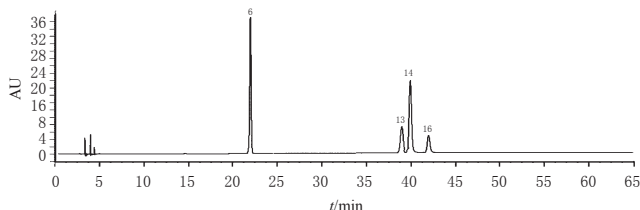


图4 10批益母草颗粒的PCA得分图

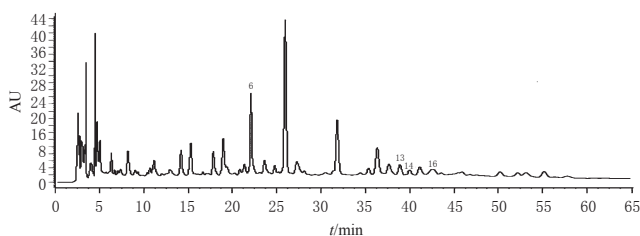
## 2.7 益母草颗粒中4个指标成分的含量测定

2.7.1 系统适用性试验 取“2.2”项下混合对照品溶液、“2.3”项下供试品溶液(S6)及空白溶液(50%甲醇)各适量,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图5)。结果显示,空白溶液对测定无干扰,4个待测成分的色谱峰均能达到基线分离,且与相邻色谱峰间的分离度均大于1.5,理论板数均大于3000,说明本方法的系统适用性较好。

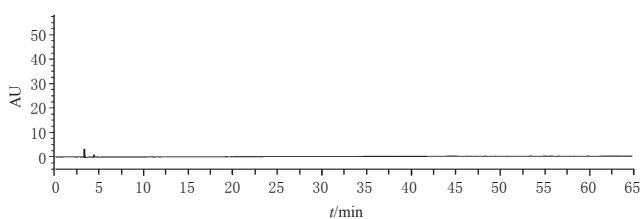
2.7.2 线性关系考察 分别取盐酸益母草碱对照品溶液(质量浓度分别为12.01、18.99、30.88、48.99、78.00、124.81  $\mu\text{g/mL}$ ,以50%甲醇制得,下同)、阿魏酸对照品溶液(质量浓度分别为1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00  $\mu\text{g/mL}$ )、芦丁对照品溶液(质量浓度分别为1.16、2.08、4.04、6.04、8.00、14.99  $\mu\text{g/mL}$ )、金丝桃苷对照品溶液(质量浓度分别为1.01、1.99、4.00、6.01、8.00、11.99  $\mu\text{g/mL}$ ),按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各对照品的质量浓度为横坐标( $X, \mu\text{g/mL}$ )、峰面积为纵坐标( $Y$ )绘制回归曲线,并求出回归方程和相关系数( $r$ )。结果,4个待测成分在其相应质量浓度范围内与其峰面积均呈现良好的线性关系( $r$ 均大于0.9990),结果见表2。



A.混合对照品溶液



B.供试品溶液



C.空白溶液

6: 盐酸益母草碱;13:阿魏酸;14:芦丁;16:金丝桃苷

图5 益母草颗粒中4个成分的系统适用性试验色谱图

表2 益母草颗粒中4个指标成分的线性关系考察结果

指标成分	回归方程	r	线性范围/( $\mu\text{g/mL}$ )
盐酸益母草碱	$Y=0.1265X+0.3232$	0.9994	12.01~124.81
阿魏酸	$Y=0.2607X+0.0867$	0.9996	1.00~10.00
芦丁	$Y=0.0833X+0.0145$	0.9998	1.16~14.99
金丝桃苷	$Y=0.1071X+0.1425$	0.9997	1.01~11.99

2.7.3 定量限与检测限 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液适量,用50%甲醇逐级稀释后,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以信噪比10:1、3:1对应的质量浓度分别作为定量限和检测限。结果显示,盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷的定量限依次为24.54、4.00、8.08、8.33  $\text{ng/mL}$ ,检测限依次为6.14、1.00、2.01、2.08  $\text{ng/mL}$ 。

2.7.4 精密度试验 称取益母草颗粒样品(S6)适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积,并计算峰面积的RSD值。结果显示,盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷峰面积的RSD依次为1.99%、1.14%、1.63%、1.81% ( $n=6$ ),表明该仪器的精密度较好。

2.7.5 稳定性试验 称取益母草颗粒样品(S6)适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在室温(10~30  $^{\circ}\text{C}$ )下分别放置0、2、4、8、12、18、24 h,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算峰面积的RSD值。结果显示,盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷峰面积的RSD依次为1.88%、1.54%、0.86%、1.95% ( $n=7$ ),表明供试品溶液在室温下放置24 h稳定性良好。

2.7.6 重复性试验 取益母草颗粒样品(S6)适量,共称取6份,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并以外标法计算样品中盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷的含量。结果显示,4个指标成分含量的RSD依次为1.94%、0.78%、1.40%、0.63% ( $n=6$ ),表明本方法的重复性较好。

2.7.7 加样回收率试验 取已知含量的益母草颗粒样品(S6)2.0 g,共称取6份,置于10 mL量瓶中,分别按已知成分含量相同的量加入相应对照品溶液,然后按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品中盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷的加样回收率。结果显示,4个指标成分的平均加样回收率依次为100.00%、99.29%、97.65%、100.46%,RSD依次为1.98%、1.57%、1.48%、1.45% ( $n=6$ ),表明本方法的准确度较好,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果( $n=6$ )

待测成分	样品含量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	加样回收 率/%	平均加样回 收率/%	RSD/ %			
盐酸益母草碱	250.28	250.73	500.56	99.82	100.00	1.98			
	253.03	250.73	506.07	100.92					
	242.02	250.73	484.03	96.52					
	248.90	250.73	497.80	99.27					
	254.41	250.73	508.82	101.47					
	255.79	250.73	511.58	102.02					
阿魏酸	19.94	20.38	39.87	97.79	99.29	1.57			
	20.27	20.38	40.34	98.48					
	20.05	20.38	40.10	98.38					
	20.49	20.38	40.57	98.53					
	20.64	20.38	41.27	101.23					
	20.86	20.38	41.51	101.32					
	芦丁	29.76	29.42	58.93			99.15	97.65	1.48
		28.81	29.42	57.34			96.97		
		28.94	29.42	57.02			95.45		
		29.76	29.42	58.93			99.15		
金丝桃苷	30.36	29.42	59.25	98.20	100.46	1.45			
	28.81	29.42	57.34	96.97					
	15.01	14.45	29.73	101.87					
	14.83	14.45	29.52	101.66					
	14.76	14.45	29.09	99.17					
	14.48	14.45	28.67	98.20					
	15.35	14.45	29.94	100.97					
14.73	14.45	29.31	100.90						

2.7.8 样品含量测定 分别称取10批益母草颗粒样品4.0 g,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并以外标法计算样品中盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷的含量。结果显示,10批益母草颗粒中4个指标成分的含量依次为122.10~138.82、9.33~10.45、14.12~18.95、5.87~8.06  $\mu\text{g/g}$ ,平均含量依次为126.81、9.96、16.96、7.15  $\mu\text{g/g}$ ,不同批次样品间4个指标成分的含量变化较小、样品质量较稳定,详见表4。

表4 10批益母草颗粒中4个指标成分含量测定结果  
( $n=3, \mu\text{g/g}$ )

样品编号	盐酸益母草碱	阿魏酸	芦丁	金丝桃苷
S1	132.38	10.23	18.35	8.06
S2	138.82	10.45	18.95	7.69
S3	128.23	10.26	18.35	8.04
S4	125.30	9.89	15.62	6.69
S5	126.07	10.01	17.78	7.67
S6	122.10	9.33	14.12	5.87
S7	123.96	10.10	17.84	7.08
S8	122.24	10.04	17.72	7.62
S9	123.09	9.90	15.65	6.73
S10	125.93	9.40	15.20	6.08
平均值	126.81	9.96	16.96	7.15
RSD/%	4.12	3.59	9.73	11.01

### 3 讨论

#### 3.1 供试品溶液制备方法的确定

在前期预实验中,笔者考察了甲醇和乙醇(体积分数均为100%)2种提取溶剂对益母草颗粒中有效成分提取效果的影响。结果显示,当以甲醇为提取溶剂时,图谱中色谱峰数量较多;而以乙醇为提取溶剂时,图谱中色谱峰数量较少且峰形较差。因此,本研究最终确定以甲醇为提取溶剂。此外,笔者还依次考察了不同提取方法(超声提取法和加热回流提取法)、不同提取时间(20、40、60 min)、不同体积分数的提取溶剂(30%、50%、70%、100%甲醇)、不同提取溶剂用量(10、25、50 mL)对益母草颗粒中有效成分提取效果的影响。结果,用25 mL 50%甲醇溶解并稀释样品,然后在功率600 W、频率40 kHz的条件下超声提取40 min所得提取物的图谱中色谱峰数量较多且分离效果较好,故最终确定将上述条件作为本研究中供试品溶液的制备方法。

#### 3.2 色谱条件的选择

在色谱条件的优化过程中,笔者前期采用二极管阵列检测器在190~400 nm波长范围内检视供试品溶液的光谱图,对不同检测波长下样品色谱峰的数量、峰形及基线稳定性等进行比较分析。结果,在波长280 nm处,色谱信息丰富、峰形较好,且基线稳定,能够反映样品中化学组分的全貌,故本研究最终选择280 nm作为检测波长。同时,笔者比较了不同流动相体系(甲醇-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液和乙腈-水)、不同生产厂家和品牌的色谱柱(Inertsil™ ODS-3柱、Welch XB-C<sub>18</sub>柱和Agilent ZORBAX SB-Aq柱)、不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)、不同柱温(25、30、35 ℃)以及不同进样量(5、10 μL)对各成分分离效果的影响。结果显示,当流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液、色谱柱为Inertsil™ ODS-3、流速为1.0 mL/min、柱温为25 ℃和进样量为5 μL时,所得图谱中各色谱峰间的分离度均相对较好、基线平稳,且色谱峰数量较多,故本研究最终选择上述色谱条件开展实验。

#### 3.3 聚类分析与PCA结果分析

本研究利用聚类分析与PCA相结合的方法,对不同批次益母草颗粒样品进行了聚类鉴别和判别分析。聚类分析是通过各观察样品或变量之间亲疏关系统计量(距离)的分析比较,可将性质相近的事物归在同一类,而将性质差别比较大的事物归在不同类,侧重于找出样品或变量之间的共性<sup>[13-14]</sup>。PCA是在基本保留原始变量信息的前提下,利用降维技术将原多个具有一定相关性的指标组合成少数几个相互无关的综合指标,侧重于全面反映多个原始指标所提供的信息<sup>[11-12]</sup>。在聚类分析中,10批益母草颗粒样品被聚为4大类:第1类为S4~S6、S8~S10,第2类为S1、S2,第3类为S3,第4类为S7。同时,在PCA中,3个主成分的累计方差总贡献率为90.987%,同样聚为4大类,与PCA结果一致。

#### 3.4 指纹图谱及含量测定结果分析

盐酸益母草碱是益母草的主要有效成分,在指纹图谱中,其色谱峰响应值较大、分离良好,且其平均峰面积约占共有峰总峰面积的13%,保留时间较为稳定且适中,峰纯度高,故本研究选择其作为益母草颗粒指纹图谱的参照峰(S)。本研究建立了10批益母草颗粒样品的指纹图谱,通过分析发现,10批样品指纹图谱相似度均在0.970以上,表明同一厂家、不同批次益母草颗粒样品的化学成分组成基本相同。经全谱峰模式自动匹配后共生成16个共有峰,并通过与混合对照品溶液色谱图比对,指认出了其中4个成分,依次为盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁和金丝桃苷。为进一步比较不同批次益母草颗粒之间的质量差异,本研究选择指认出的4种成分建立了含量测定方法。含量测定结果显示,盐酸益母草碱在益母草颗粒中的含量相对较高;但总体而言,不同批次益母草颗粒样品中这4个指标成分的含量差异性不明显,产品批间稳定性较好,表明企业在药材选择及生产工艺上进行了严格控制,从而保证了产品整体质量的稳定性和均一性。根据相关文献报道,盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷4个成分均具有抗心肌缺血的活性<sup>[15-18]</sup>,而益母草颗粒具有活血调经的功效,推测这4个成分可能与该药活血调经作用密切相关,可为下一步的药效物质基础研究提供参考。

综上所述,本研究成功建立了益母草颗粒的HPLC指纹图谱,并测定了其中盐酸益母草碱、阿魏酸、芦丁、金丝桃苷4个指标成分的含量;所建方法简便易行、准确度高、重复性好,可用于益母草颗粒的质量控制。

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:1518.
- [2] 李锟,王树真,李乐,等.益母草的化学成分和药理作用研究进展[J].广东化工,2014,41(2):54-55.

- [3] 张雪,宋玉琴,杨雨婷,等.益母草活血化痰化学成分与药理作用研究进展[J].药物评价研究,2015,38(2):214-217.
- [4] 熊亮,彭成.基于中药质量标志物(Q-Marker)的基本条件研究益母草和赶黄草的Q-Marker[J].中草药,2016,47(13):2212-2220.
- [5] 乔晶晶,吴啟南,薛敏,等.益母草化学成分与药理作用研究进展[J].中草药,2018,49(23):5691-5704.
- [6] 李聘,陆治名,张百霞.益母草中黄酮类成分的研究进展[J].医学研究与教育,2017,34(4):63-68.
- [7] 李建芳.益母草药学研究进展[J].内科,2013,8(5):533-536.
- [8] 王宁莉,张书华,王丽霞.益母草颗粒中盐酸水苏碱与盐酸益母草碱的含量测定[J].延安大学学报(医学科学版),2015,13(2):4-6,10.
- [9] 李伟,张建军,王小花,等. HPLC-ELSD测定益母草颗粒中盐酸水苏碱的含量[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(23):100-103.
- [10] 伍涛,肖裕章,李成洪,等. HPLC-DAD法测定益母草颗粒中盐酸水苏碱含量的方法[J].甘肃农业大学学报,2020,55(3):23-28,37.
- [11] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等.中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J].中草药,2016,47(22):4085-4094.
- [12] 马丽娜,张岩,陶遵威.色谱分析技术在中药指纹图谱研究中的应用[J].药物评价研究,2012,35(1):58-62.
- [13] 李新蕊.主成分分析、因子分析、聚类分析的比较与应用[J].山东教育学院学报,2007(6):23-26.
- [14] 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.
- [15] 熊莺,杨解人.益母草碱对大鼠急性心肌缺血损伤心肌肌钙蛋白T的影响[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(2):21-24.
- [16] 杨家荣,张密霞,常亮堂,等.川芎嗪、阿魏酸及其配伍对心肌缺血再灌注模型大鼠的保护作用及对黏附分子的影响[J].中草药,2008,39(7):1054-1056.
- [17] 赵一灿,张丽华,赵文,等.芦丁对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].郑州大学学报(医学版),2017,52(5):562-566.
- [18] 李国栋,薛涛,黄学锋.金丝桃苷对心肌缺血再灌注损伤大鼠的心脏保护作用[J].中国临床药理学杂志,2020,36(22):3721-3724.

(收稿日期:2021-10-05 修回日期:2021-12-27)

(编辑:林 静)

(上接第585页)

- [7] SHAW L H, CHEN W M, TSAI T H. Identification of multiple ingredients for a traditional Chinese medicine preparation (bu-Yang-Huan-wu-Tang) by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. Molecules, 2013, 18(9):11281-11298.
- [8] WEI W L, HUANG L F. Simultaneous determination of ferulic acid and phthalides of *Angelica sinensis* based on UPLC-Q-TOF/MS[J]. Molecules, 2015, 20(3):4681-4694.
- [9] 王希梅,赵泽军,张葵,等.当归不同提取方法提取物中挥发性成分比较研究[J].中兽医医药杂志,2018,37(1):61-65.
- [10] 李宁.基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术的参桂胶囊中主要化学成分研究[J].中草药,2019,50(3):573-581.
- [11] 张清清,冯媛,杨贵雅,等.基于气相色谱-质谱联用技术的当归提取物化学成分研究[J].广东化工,2021,48(5):175-178.
- [12] 赵静,夏晓培.当归的化学成分及药理作用研究现状[J].临床合理用药杂志,2020,13(6):172-174.
- [13] 黄雯雯.川芎和少花蒺藜草中活性物质的分离纯化及结构鉴定[D].北京:北京化工大学,2013.
- [14] GONG W X, ZHU S W, CHEN C C, et al. The anti-depression effect of *Angelicae sinensis* Radix is related to the pharmacological activity of modulating the hematological anomalies[J]. Front Pharmacol, 2019, 10:192.
- [15] 孙敏,马清林,刘峰林,等.当归挥发油研究新进展[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(16):56-58.
- [16] 张来宾,吕洁丽,陈红丽,等.当归中苯酚类成分及其药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(2):167-176.
- [17] 陈琳,朱靖,王嵩,等.当归主要活性成分提取方法及其活性研究进展[J].上海医药,2021,42(9):71-75.
- [18] 黄红泓,覃日宏,柳贤福.中药当归的化学成分分析与药理作用探究[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(58):127,153.

(收稿日期:2021-11-30 修回日期:2022-01-11)

(编辑:林 静)