

# 潜阳育阴颗粒UPLC指纹图谱和多成分定量方法的建立<sup>Δ</sup>

韩 洋<sup>1,2\*</sup>, 曹 园<sup>1#</sup>(1.南京中医药大学附属医院/江苏省中医院药学部,南京 210029;2.南京中医药大学药学院,南京 210023)

中图分类号 R917;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)20-2481-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.20.10



**摘要** 目的 建立潜阳育阴颗粒的指纹图谱和多成分定量方法。方法 采用超高效液相色谱(UPLC)法,以马钱苷峰为参照,建立15批潜阳育阴颗粒的UPLC指纹图谱,确定共有峰并采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》评价相似度;进行聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)、偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA),并以变量重要性投影(VIP)值大于1.0为标准筛选影响潜阳育阴颗粒质量的差异性成分;采用UPLC法测定差异性成分和哈巴苷、阿魏酸、杯苋甾酮的含量。结果 15批潜阳育阴颗粒样品有18个共有峰,相似度均大于0.96;指认峰6为莫诺苷,峰7为马钱苷,峰11为金丝桃苷,峰12为二苯乙烯苷,峰13为阿魏酸,峰14为杯苋甾酮,峰16为哈巴俄苷,峰17为肉桂酸,峰18为大黄素。CA和PCA结果均显示,15批样品可分为6类,S1、S2、S4~S6为一类;S3为一类,S7、S8为一类,S9、S10为一类,S11~S14为一类,S15为一类;PLS-DA结果显示,峰3、9、6(莫诺苷)、7(马钱苷)、15、12(二苯乙烯苷)、16(哈巴俄苷)的VIP值均大于1.0。15批样品中,哈巴苷、哈巴俄苷、莫诺苷、马钱苷、二苯乙烯苷、阿魏酸、杯苋甾酮的含量分别为0.336~0.563、0.205~0.377、0.692~0.837、0.433~0.562、1.294~2.030、0.020~0.027、0.167~0.235 mg/g。结论 成功建立了潜阳育阴颗粒的UPLC指纹图谱和多成分定量方法,可用于提高和完善该制剂的质量控制标准;莫诺苷、马钱苷、二苯乙烯苷、哈巴俄苷等可能是影响该制剂质量的差异性成分。

**关键词** 潜阳育阴颗粒;超高效液相色谱法;指纹图谱;多成分定量分析

## Establishment of UPLC fingerprint and quantitative method of multi-components for Qianyang yuyin granules

HAN Yang<sup>1,2</sup>, CAO Yuan<sup>1</sup> (1. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine/Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To establish a fingerprint and quantitative method of multi-components for Qianyang yuyin granules. **METHODS** Using the peak of loganin as reference, fingerprints of 15 batches of Qianyang yuyin granules were established by ultra-high liquid chromatography (UPLC). The common peaks were identified and the similarity analysis was performed by *Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of TCM* (2004A edition). Cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) were performed, and the differential components affecting the quality of Qianyang yuyin granules were screened by the criterion of the value of variable importance in the projection (VIP) > 1.0. UPLC was used to determine the contents of the differential components and harpagide, ferulic acid, cyasterone. **RESULTS** A total of 18 common peaks were identified from the fingerprints of 15 batches of samples, and the similarities were all higher than 0.96. It was identified that peak 6 was morroniside, peak 7 was loganin, peak 11 was hyperoside, peak 12 was stilbene glycoside, peak 13 was ferulic acid, peak 14 was cyasterone, peak 16 was harpagoside, peak 17 was cinnamic acid, and peak 18 was emodin. The results of CA and PCA showed that the 15 batches of samples could be divided into 6 categories. S1, S2, S4-S6 were grouped into one category, S3 was grouped into one category, S7-S8 were grouped into one category, S9-S10 were grouped into one category, S11-S14 were grouped into one category, S15 was grouped into one category. VIP values of peak 3, 9, 6 (morroniside), 7 (loganin), 15, 12 (stilbene glycoside) and 16 (harpagoside) were greater than 1.0. Among 15 batches of samples, the contents of harpagide, harpagoside, morroniside, loganin, stilbene glycoside, ferulic acid and cyasterone were 0.336-0.563, 0.205-0.377, 0.692-0.837, 0.433-0.562, 1.294-2.030, 0.020-0.027, 0.167-0.235 mg/g, respectively. **CONCLUSIONS** The UPLC fingerprint and multi-components quantitative analysis of Qianyang yuyin granules are successfully

<sup>Δ</sup>基金项目 江苏省中医药局科技项目(No.JD201813);南京中医药大学中药优势学科三期项目立项开放课题(No.ZYX03KF074)

\*第一作者 硕士研究生。研究方向:中药质量控制技术与方法。  
E-mail:2605734671@qq.com

#通信作者 研究员,硕士生导师,博士。研究方向:中药药效物质与质量标准。E-mail:caoy2002@126.com

established, which can be used to improve the quality control standard of the preparation; morroniside, loganin, stilbene glycoside, harpagoside and other components could be the differential components affecting the quality of this preparation.

**KEYWORDS** Qianyang yuyin granules; ultra-high liquid chromatography; fingerprint; multi-components quantitative analysis

高血压疾病的防控工作对遏制心血管疾病的流行十分重要。中医药因其辨证论治及整体性的特点,在我国高血压疾病的诊疗领域发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。潜阳育阴颗粒是南京中医药大学附属医院/江苏省中医院的特色医院制剂,对高血压肾损害的疗效确切<sup>[2-3]</sup>。该制剂由鬼针草、制首乌、酒萸肉、玄参、川牛膝、泽泻6味中药配伍而成,含有环烯醚萜苷、黄酮、二苯乙烯苷等多类成分<sup>[4]</sup>。

不同批次产品质量的稳定性是中药复方制剂发挥临床疗效的重要前提<sup>[5]</sup>。由于中药复方制剂成分复杂,单一指标成分的定量分析难以全面表征制剂的整体质量<sup>[6]</sup>。中药指纹图谱能反映中药多成分作用特点,在中药复方制剂的质量控制领域得到了广泛应用<sup>[7-8]</sup>。化学模式识别可对中药指纹图谱的色谱信息进行深入挖掘,以筛选差异标志物,对中药及其复方制剂的质量控制与评价具有重要意义<sup>[9-10]</sup>。

本课题组前期已对潜阳育阴颗粒的化学成分进行了鉴定并预测了潜在质量标志物<sup>[4]</sup>。鉴于该药现行质量标准仅以二苯乙烯苷为指标成分,难以有效控制其整体质量,故本研究拟建立潜阳育阴颗粒的指纹图谱,进行化学模式识别分析并筛选差异性成分;同时,考虑到哈巴苷和阿魏酸具有抗高血压、抗炎、抗氧化、保护心脏等功效<sup>[11-12]</sup>,因此将这2个化合物与川牛膝指标成分杯苋甾酮<sup>[13]</sup>一并纳入定量检测,以期全面评价潜阳育阴颗粒的质量和其质量控制水平奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

H-CLASS型超高效液相色谱(UPLC)仪购自美国Waters公司;AUW220D型电子分析天平购自日本Shimadzu公司;WB200UCX型液晶超声清洗器购自上海望标仪器有限公司。

### 1.2 药材与试剂

潜阳育阴颗粒(批号分别为2101001、2101003、2012033、2103009、2103013、2104015、2104017、2104018、2105019、2105020、2106023、2107027、2107028、2108030、2109032,依次编号S1~S15)由南京中医药大学附属医院/江苏省中医院提供。各对照品的来源信息见表1;各单味药材均购自安徽省万生中药饮片有限公司,经南京中医药大学附属医院/江苏省中医院药学部曹园研究员鉴定均为真品。甲醇、乙腈和磷酸均为色谱纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 UPLC指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>(100 mm×3.0 mm, 1.7 μm);流动相A为乙腈,流动相B为水(含0.1%磷酸),采用梯度洗脱方法(0~5.0 min, 3%A→8%A; 5.0~11.0 min, 8%A→30%A;

表1 潜阳育阴颗粒各对照品的来源信息

对照品	批号	来源	纯度/%
哈巴苷	111729-201707	中国食品检定研究院	96.8
哈巴俄苷	MUST-18041504	成都曼思特生物科技有限公司	>98
马钱苷	MUST-17080704	成都曼思特生物科技有限公司	>98
二苯乙烯苷	MUST-18051611	成都曼思特生物科技有限公司	>98
金丝桃苷	MUST-17101605	成都曼思特生物科技有限公司	>98
大黄素	200148-200904	泰州丹鼎生物科技有限公司	>98
杯苋甾酮	200471-200903	泰州丹鼎生物科技有限公司	91
莫诺苷	200514-200704	泰州丹鼎生物科技有限公司	92.5
阿魏酸	200418-170917	泰州丹鼎生物科技有限公司	97.3
肉桂酸	b21082	上海源叶生物科技有限公司	>98

11.0~20.0 min, 30%A→80%A; 20.0~21.0 min, 80%A→95%A; 21.0~23.0 min, 95%A; 23.0~23.5 min, 95%A→3%A; 23.5~30.0 min, 3%A);检测波长为250 nm;流速为0.3 mL/min;柱温为35 °C;进样量为1 μL。

2.1.2 供试品溶液的制备 将潜阳育阴颗粒粉碎,取粉末约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入70%甲醇20 mL,密塞,称定质量,摇匀后超声(功率100 W,频率40 kHz)提取20 min,放冷,再次称定质量,用相同溶剂补足减失的质量,摇匀后静置,取上清液过0.22 μm滤膜,即得全方供试品溶液。按潜阳育阴颗粒处方比例分别称取鬼针草22.5 g、制首乌5.0 g、玄参5.0 g、酒萸肉3.0 g、川牛膝7.5 g、泽泻5.0 g,按上述方法制备单味药供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取杯苋甾酮、莫诺苷、金丝桃苷、马钱苷、哈巴俄苷、阿魏酸、大黄素、二苯乙烯苷、肉桂酸对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为0.267 0、0.105 0、0.092 0、0.361 0、0.221 0、0.249 0、0.040 0、0.228 0、0.339 0 mg/mL的单一对照品溶液(哈巴苷在250 nm波长下无吸收,故未考虑)。取各对照品溶液适量于10 mL量瓶中混匀,加甲醇制成质量浓度分别为0.001 9、0.010 5、0.000 7、0.007 2、0.001 5、0.000 7、0.001 0、0.041 4、0.002 4 mg/mL的混合对照品溶液。

2.1.4 精密度试验 取潜阳育阴颗粒样品(编号S1),按照“2.1.2”项下方法制备全方供试品溶液,再按照“2.1.1”项下色谱条件连续测定6次,以马钱苷峰(分离度好、峰形稳定)为参照,计算得各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.50%(n=6),相对峰面积的RSD均小于4.60%(n=6),表明该方法精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取潜阳育阴颗粒样品(编号S1),按照“2.1.2”项下方法制备全方供试品溶液,然后在室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以马钱苷峰为参照,计算得各共有峰相对峰面积的RSD均小于4.70%(n=6),相对保留时间的RSD均小于2.90%(n=6),表明该溶液在室温下放置24 h内稳定。

2.1.6 重复性试验 取潜阳育阴颗粒样品(编号S1)6份,按照“2.1.2”项下方法制备全方供试品溶液,再按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以马钱苷峰为参照,计算得各共有峰相对峰面积的RSD均小于1.90%(n=6),相对保留时间的RSD均小于0.09%(n=6),表明方法重

复性良好。

2.1.7 指纹图谱建立与相似度评价 取15批潜阳育阴颗粒样品,按照“2.1.2”项下方法制备全方供试品溶液,再按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。使用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)》,随机选择S15样品图谱为参照,设置时间窗宽度为0.2 min,以中位数法建立对照指纹图谱(R)和叠加指纹图谱(图1)。由图1可知,叠加指纹图谱有共有峰18个。以对照指纹图谱为参照,计算得S1~S15样品的相似度为0.966~0.997,提示各批样品的相似度较高。

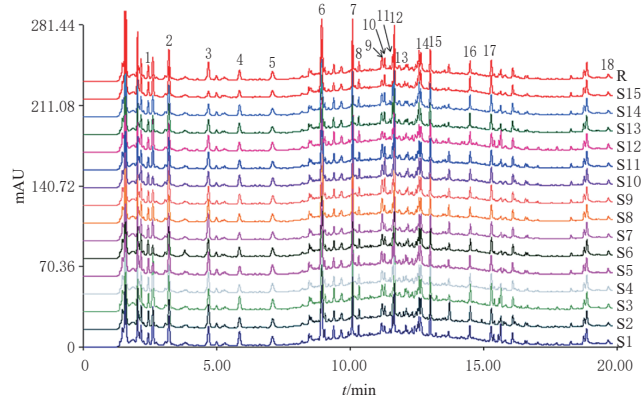


图1 15批潜阳育阴颗粒样品的UPLC对照指纹图谱和叠加指纹图谱

2.1.8 共有峰归属与指认 取“2.1.2”项下全方及单味药供试品溶液、“2.1.3”项下混合对照品溶液适量,按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定并记录色谱图。结合光电二极管检测器扫描,最终判定峰1、15来源于泽泻,峰2来源于酒萸肉,峰3~8、10主要来源于酒萸肉,峰9、11主要来源于鬼针草,峰12来源于制首乌,峰13、14来源于川牛膝,峰16、17来源于玄参,峰18来源于制首乌、泽泻。结果见图2。

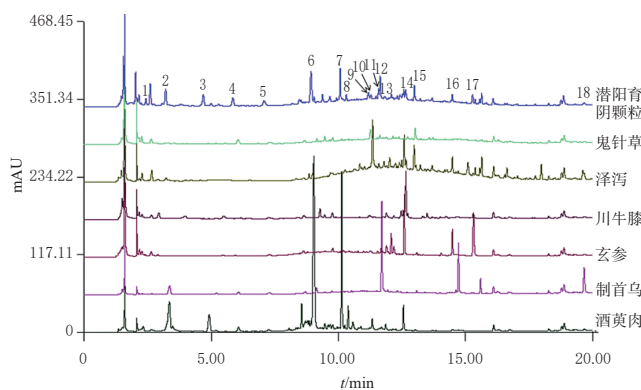
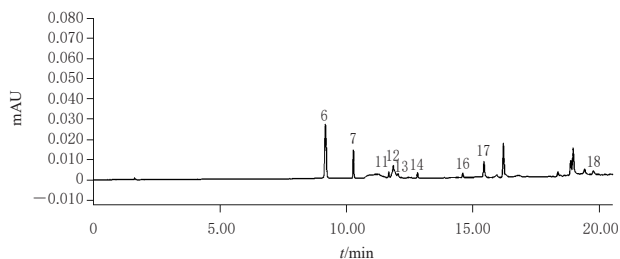


图2 潜阳育阴颗粒全方供试品溶液及单味药供试品溶液的UPLC图

经与混合对照品溶液色谱图比较,共指认出9个化学成分:峰6莫诺苷、峰7马钱苷、峰11金丝桃苷、峰12二苯乙烯苷、峰13阿魏酸、峰14杯苋甾酮、峰16哈巴俄苷、峰17肉桂酸、峰18大黄素。结果见图3。



6:莫诺苷;7:马钱苷;11:金丝桃苷;12:二苯乙烯苷;13:阿魏酸;14:杯苋甾酮;16:哈巴俄苷;17:肉桂酸;18:大黄素

图3 潜阳育阴颗粒混合对照品溶液的UPLC图

## 2.2 化学模式识别分析

2.2.1 聚类分析 使用SPSS 22.0软件,以18个共有峰峰面积为变量,采用组间连接法以平方欧氏距离为测度进行聚类分析(cluster analysis, CA)。结果(图4)显示,当距离为10时,15批潜阳育阴颗粒可聚为6类:S1、S2、S4~S6为一类,S3为一类,S7、S8为一类,S9、S10为一类,S11~S14为一类,S15为一类。

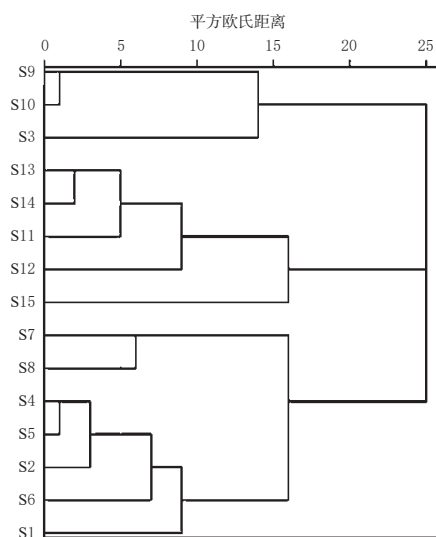


图4 15批潜阳育阴颗粒的CA树状图

2.2.2 主成分分析 使用SIMCA 14.1软件,以18个共有峰峰面积为变量进行主成分分析(principal components analysis, PCA)。由PCA得分图(图5A)可知,S1、S2、S4~S6为一类,S3为一类,S7、S8为一类,S9、S10为一类,S11~S14为一类,S15为一类。由PCA载荷图(图5B)可知,峰2~7、9、10、12、14、17距离原点较远,表明其对应成分对潜阳育阴颗粒的质量影响较大<sup>[14]</sup>。

2.2.3 偏最小二乘法-判别分析 为更好地分析不同批次潜阳育阴颗粒样品间的差异,本研究利用SIMCA 14.1软件,以18个共有峰峰面积为变量进行偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA),并筛选变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP)值>1.0的成分作为质量差异性成分<sup>[15]</sup>。PLS-DA得分图(图6A)显示,15批潜阳育阴颗粒可分为6类,S1、S4、S6为一类,S2、S3、S5为一类,S7~

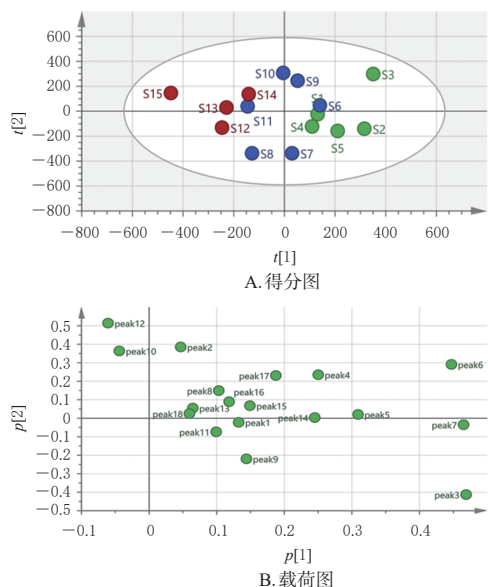


图5 15批潜阳育阴颗粒PCA得分图及载荷图

S10为一类,S11为一类,S12~S14为一类,S15为一类。VIP图(图6B)显示,峰3、9、6(莫诺苷)、7(马钱苷)、15、12(二苯乙烯苷)、16(哈巴俄苷)的VIP值分别为1.77、1.51、1.38、1.34、1.12、1.09、1.05,提示莫诺苷、马钱苷、二苯乙烯苷、哈巴俄苷等成分可能是影响潜阳育阴颗粒样品质量的差异性成分。

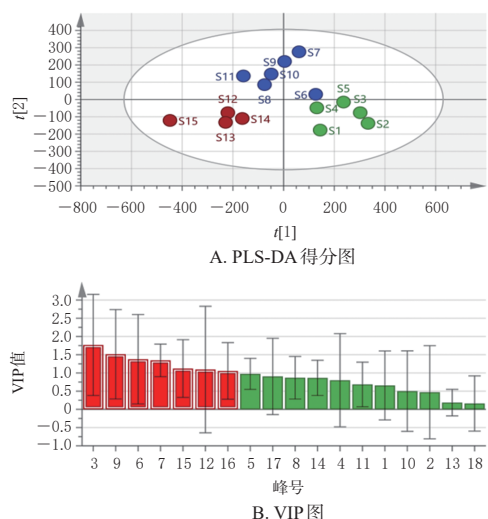


图6 15批潜阳育阴颗粒PLS-DA得分图及各共有峰的VIP图

### 2.3 潜阳育阴颗粒多成分含量的测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>(100 mm×3.0 mm, 1.7 μm);流动相A为乙腈,流动相B为水(含0.1%磷酸),采用梯度洗脱方法(0~15 min, 5%A→15%A; 15~30 min, 15%A→30%A; 30~40 min, 30%A→80%A; 40~42 min, 80%A→95%A);检测波长分别为320 nm(阿魏酸、二苯乙烯苷)、250 nm(莫诺苷、杯苋甾酮、马钱苷)、202 nm(哈巴苷、哈巴俄苷);流速为0.3 mL/min;柱温为35 °C;进样量为2 μL。

2.3.2 供试品溶液的制备 按照“2.1.2”项下方法制备全方供试品溶液,并于进样前稀释5倍。

2.3.3 对照品溶液的制备 精密称取哈巴苷、哈巴俄苷、莫诺苷、马钱苷、阿魏酸、杯苋甾酮对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为0.019 4、0.011 4、0.017 4、0.013 4、0.000 5、0.005 2 mg/mL的混合对照品溶液;另精密称取二苯乙烯苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度为0.273 0 mg/mL的对照品溶液。

2.3.4 专属性考察 取“2.3”项下供试品溶液、对照品溶液(混合对照品与二苯乙烯苷对照品溶液各取适量混合)和空白溶液(70%甲醇)适量,按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,各色谱峰分离度均大于1.5,空白溶液对各成分的检测无干扰。结果见图7(空白图略)。

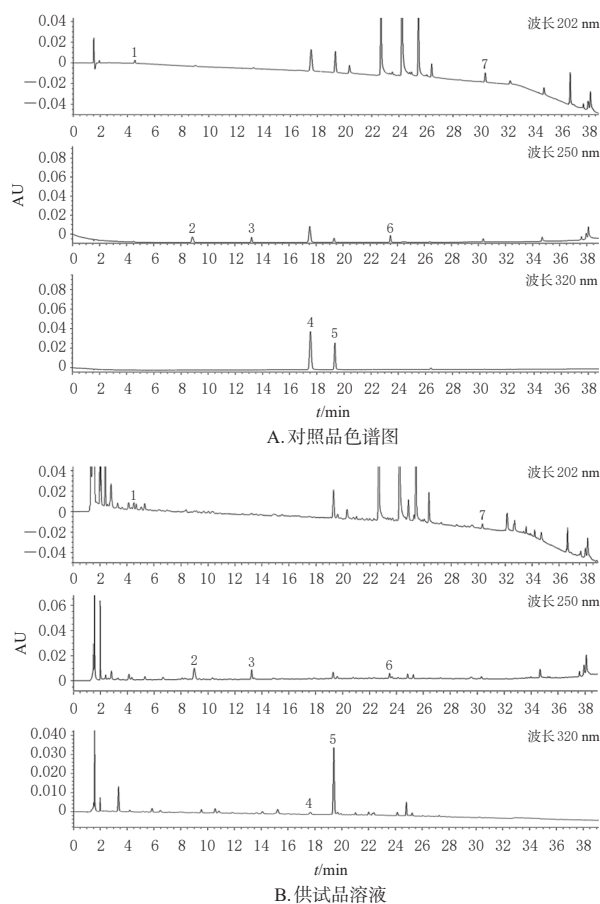


图7 潜阳育阴颗粒专属性考察的UPLC图

### 2.3.5 标准曲线及线性范围考察

取“2.3.3”项下混合对照品溶液,分别用甲醇稀释0、2、5、10、20倍;取“2.3.3”项下二苯乙烯苷对照品溶液,分别用甲醇稀释0、1.5、3、7.5、15倍。取上述溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件分别进样,记录峰面积。以待测成分质量浓度为横坐标(X)、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,结果见表2。

2.3.6 精密度试验 取“2.3.3”项下混合对照品溶液和二苯乙烯苷对照品溶液适量,混合后按照“2.3.1”项下色

表2 哈巴昔等待测成分的回归方程、相关系数及线性范围

待测成分	回归方程	相关系数( <i>r</i> )	线性范围/( $\mu\text{g/mL}$ )
哈巴昔	$Y=6 \times 10^3 X - 222.99$	0.999 7	0.968~19.360
哈巴俄昔	$Y=1 \times 10^6 X + 208.62$	0.999 9	0.568~11.350
莫诺昔	$Y=1 \times 10^6 X + 1098$	0.999 9	0.870~17.390
马钱昔	$Y=7 \times 10^3 X + 360.27$	0.999 7	0.670~13.400
二苯乙烯昔	$Y=8 \times 10^3 X - 114.904$	0.999 0	18.200~273.000
阿魏酸	$Y=3 \times 10^3 X - 1.952.3$	0.999 8	0.025~0.490
杯苋甾酮	$Y=8 \times 10^3 X + 62.944$	0.999 9	0.259~5.187

谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果显示,哈巴昔、哈巴俄昔、莫诺昔、马钱昔、二苯乙烯昔、阿魏酸、杯苋甾酮峰面积的RSD分别为3.88%、3.71%、3.36%、3.67%、2.85%、3.05%、3.22% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 按照“2.3.2”项下方法制备潜阳育阴颗粒(编号S1)供试品溶液,分别在室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,哈巴昔、哈巴俄昔、莫诺昔、马钱昔、二苯乙烯昔、阿魏酸、杯苋甾酮峰面积的RSD分别为2.59%、1.71%、0.28%、3.30%、1.22%、1.87%、2.32% ( $n=6$ ),表明该溶液在室温下放置24 h内稳定。

2.3.8 重复性试验 取同一批次潜阳育阴颗粒样品(编号S1)6份,按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算含量。结果显示,哈巴昔、哈巴俄昔、莫诺昔、马钱昔、二苯乙烯昔、阿魏酸、杯苋甾酮含量的RSD分别为3.59%、4.71%、3.66%、4.07%、4.89%、4.70%、3.96% ( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率试验 取已知含量的同一批次潜阳育阴颗粒样品(编号S1)6份,精密加入哈巴昔、哈巴俄昔、莫诺昔、马钱昔、二苯乙烯昔、阿魏酸、杯苋甾酮单一对照品溶液(以甲醇为溶剂配制,对应加入量分别为0.125 0、0.066 7、0.210 0、0.132 0、0.173 8、0.005 8、0.057 0 mg),按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率。结果显示,各待测成分的平均加样回收率分别为105.55%、95.00%、101.32%、101.43%、97.79%、105.17%、102.28%,RSD分别为2.90%、2.53%、2.47%、4.11%、4.83%、2.07%、4.13% ( $n=6$ ),表明方法准确度良好。

2.3.10 含量测定 取15批潜阳育阴颗粒样品,按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算含量,结果见表3。

### 3 讨论

#### 3.1 提取方法的优化

本课题组前期以潜阳育阴颗粒色谱图中色谱峰数量、分离效果及哈巴昔、哈巴俄昔、莫诺昔、马钱昔、二苯乙烯昔、阿魏酸、杯苋甾酮总提取率为指标,对不同提取溶剂(甲醇、70%甲醇、50%甲醇)、溶剂用量(20、30、40

表3 15批潜阳育阴颗粒样品中7种待测成分的含量测定结果(mg/g)

编号	哈巴昔	哈巴俄昔	莫诺昔	马钱昔	二苯乙烯昔	阿魏酸	杯苋甾酮
S1	0.502	0.233	0.774	0.522	1.683	0.023	0.206
S2	0.505	0.239	0.813	0.562	1.480	0.026	0.235
S3	0.563	0.377	0.810	0.538	1.450	0.026	0.195
S4	0.449	0.253	0.706	0.484	1.294	0.025	0.194
S5	0.507	0.255	0.821	0.554	1.435	0.020	0.228
S6	0.503	0.266	0.820	0.527	1.727	0.023	0.230
S7	0.486	0.230	0.828	0.548	1.474	0.022	0.227
S8	0.449	0.210	0.692	0.457	1.496	0.022	0.195
S9	0.507	0.211	0.837	0.480	2.030	0.026	0.217
S10	0.441	0.205	0.827	0.443	1.905	0.021	0.216
S11	0.515	0.237	0.805	0.473	2.029	0.026	0.219
S12	0.336	0.251	0.712	0.452	1.535	0.023	0.167
S13	0.529	0.270	0.779	0.433	1.835	0.027	0.205
S14	0.510	0.255	0.753	0.434	1.774	0.022	0.218
S15	0.513	0.245	0.795	0.453	1.890	0.027	0.226

倍量)、提取方式(超声、回流提取)、提取时间(10、20、30 min)进行了考察,结果显示,以20倍量的70%甲醇超声提取20 min的效果最优,故采用上述方法制备供试品溶液。

#### 3.2 色谱条件的优化

本课题组前期通过二极管阵列检测器在190~400 nm波长范围内扫描发现,在250 nm波长处所得色谱峰较多且分离度较好,所以UPLC指纹图谱的检测波长设为250 nm。同时,本课题组综合2020年版《中国药典》(一部)和文献相关内容<sup>[13,16]</sup>,最终确定定量分析中哈巴昔、哈巴俄昔的检测波长为202 min,莫诺昔、杯苋甾酮、马钱昔的检测波长为250 nm,阿魏酸和二苯乙烯昔的检测波长为320 nm。

本课题组进一步考察了甲醇-水(含0.1%磷酸)、乙腈-水(含0.1%磷酸)、乙腈-水(含0.2%磷酸)等不同流动相体系及不同柱温(30、35、40 °C)对色谱峰分离的影响,最终选择流动相为乙腈-水(含0.1%磷酸),柱温为35 °C。方法学考察结果显示,在“2.1.1”“2.3.1”项下色谱条件下,所得色谱峰峰形及分离度均良好。

#### 3.3 结果分析

本研究建立了潜阳育阴颗粒的UPLC指纹图谱,该法操作简便、结果准确;15批潜阳育阴颗粒指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均大于0.96,表明15批制剂所含成分的相似度较高,质量均一、稳定。化学模式识别分析结果表明,不同批次的潜阳育阴颗粒样品具有一定的差异。其中,CA与PCA的分类结果基本一致,15批潜阳育阴颗粒样品可被分为6类,即S1、S2、S4~S6为一类,S3为一类,S7、S8为一类,S9、S10为一类,S11~S14为一类,S15为一类;PLS-DA结果则将S1、S4、S6分为一类,S2、S3、S5分为一类,S7~S10分为一类,S11分为一类,S12~S14分为一类,S15分为一类,这可能与CA、PCA和PLS-DA建模方式的不同有关。PCA载荷图与VIP值筛选结果均提示莫诺昔(峰6)、马钱昔(峰7)、二

苯乙烯苷(峰12)和哈巴俄苷(峰16)对潜阳育阴颗粒的质量影响较大,因此拟对这4种成分进行定量分析。此外,哈巴苷为玄参的指标成分,具有抗炎、抗氧化、保护神经、保护心肌等作用<sup>[11]</sup>;阿魏酸具有抗高血压、抗炎、保护心脏等作用<sup>[12]</sup>;杯苋甾酮为2020年版《中国药典》(一部)“川牛膝”项下规定的指标成分<sup>[13]</sup>,因此本研究最终选择哈巴苷、哈巴俄苷、莫诺苷、马钱苷、二苯乙烯苷、阿魏酸、杯苋甾酮进行定量分析。结果显示,15批潜阳育阴颗粒样品中各目标成分的含量有所不同,这可能与原药材本身的质量差异有关。

综上所述,本研究建立了潜阳育阴颗粒的指纹图谱及7种成分的含量测定方法,可用于提高和完善该制剂的质量控制标准;莫诺苷、马钱苷、二苯乙烯苷、哈巴俄苷等成分可能是影响该制剂质量的差异性成分。

### 参考文献

[1] 国家心血管病中心,国家基本公共卫生服务项目基层高血压管理办公室,国家基层高血压管理专家委员会,等.国家基层高血压防治管理指南2020版[J].中国循环杂志,2021,36(3):209-220.

[2] 方媛,张蓓蓓,黄辉,等.基于剪切波弹性成像技术评价潜阳育阴颗粒改善阴虚阳亢型老年高血压早期肾损害的临床研究[J].南京中医药大学学报,2022,38(4):285-290.

[3] 刘健,李碧霞,杜金玲,等.潜阳育阴颗粒治疗阴虚阳亢型高血压早期肾损害患者的临床研究[J].南京中医药大学学报,2019,35(3):262-265.

[4] 吴信华,李长印,曹园,等.基于LC/Q-TOF-MS整合网络药理学探讨潜阳育阴颗粒防治高血压肾损害的药效物质基础与作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(2):116-129.

[5] 杨琳,李廷利.基于HPLC指纹图谱结合化学模式识别的护肝片质量控制研究[J].中草药,2019,50(14):3351-

3356.

[6] 阳长明,陈霞,赵巍,等.基于源头控制的中药制剂质量研究[J].中草药,2021,52(2):321-326.

[7] 孙岩,吴晨光,韩群,等.HPLC指纹图谱结合化学模式识别评价祖师麻注射液的整体质量[J].中草药,2020,51(8):2170-2176.

[8] 褚延斌,苏小琴,周学谦,等.基于液质指纹图谱和化学模式识别的注射用益气复脉(冻干)质量综合评价研究[J].中草药,2018,49(10):2410-2419.

[9] 许啸,张淹,任雪阳,等.基于特征图谱、化学计量学和分子对接的复方阿胶浆质量标志物研究[J].中草药,2021,52(23):7148-7161.

[10] 李艳荣,杜义龙,沈莹,等.指纹图谱、多成分定量分析及化学模式识别分析相结合的心安胶囊质量评价[J].中国药房,2022,33(6):706-712.

[11] FREZZA C, DE VITA D, TONIOLO C, et al. Harpagide: occurrence in plants and biological activities: a review[J]. Fitoterapia, 2020, 147: 104764.

[12] ALAM M A. Anti-hypertensive effect of cereal antioxidant ferulic acid and its mechanism of action[J]. Front Nutr, 2019, 6: 121.

[13] 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,2020:39.

[14] 周梦楠,王亚静,张怡,等.基于HPLC指纹图谱和主成分分析考察醒脑静注射液的配伍稳定性[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(19):80-86.

[15] 赵峰,高太祥,石莉尧,等.越婢加术汤的HPLC指纹图谱建立、含量测定及化学模式识别分析[J].中国药房,2021,32(22):2724-2730.

[16] 孟龔,韩林染,徐建军,等.UPLC同时测定潜阳育阴方中7种活性成分的含量[J].南京中医药大学学报,2017,33(3):317-319.

(收稿日期:2022-04-18 修回日期:2022-08-26)

(编辑:张元媛)

(上接第2480页)

[5] 王智民,钱忠直,张启伟,等.一测多评法建立的技术指南[J].中国中药杂志,2011,36(6):657-658.

[6] 卿大双,罗维早,孙建彬,等.一测多评法测定黄连及其炮制品中6种生物碱[J].中草药,2016,47(2):324-329.

[7] 陈俊,许浚,张静雅,等.基于一测多评法对延胡索中生物碱类成分的质量控制研究[J].中草药,2016,47(3):493-498.

[8] 张勇,张玲,谢晓梅.一测多评法同时测定木瓜中2种常见三萜酸[J].中成药,2013,35(4):770-773.

[9] 冯旻璐,许海燕,贺海波,等.木瓜总三萜通过调节miR-10a和PI3K/Akt/mTOR/p70S6K信号通路诱导胃癌细胞凋亡[J].中药材,2019,42(12):2929-2935.

[10] 贺海波,李小琴,李小妹,等.木瓜总三萜和奥美拉唑联用对吡啶美辛诱导大鼠胃溃疡的治疗作用研究[J].中国中药杂志,2019,44(11):2338-2347.

[11] KAKUNO T, YOSHIKAWA K, ARIHARA S. Triterpenoid saponins from *Ilex crenata* fruit[J]. Phytochemistry, 1992, 31(10):3553-3557.

[12] TALAPATRA S K, SARKAR A C, TALAPATRA B. Two pentacyclic triterpenes from *Rubia cordifolia*[J]. Phytochemistry, 1981, 20(8):1923-1927.

[13] 阚金涛,张清豫,袁雷,等.西藏皱皮木瓜中齐墩果酸、熊果酸提取工艺优化及不同干燥方式的含量分析[J].高原农业,2019,3(3):300-307.

[14] 蔡娟,刘世尧,韦正鑫,等.皱皮木瓜皮渣齐墩果酸和熊果酸提取工艺优化研究[J].食品工业科技,2015,36(2):282-285,290.

(收稿日期:2022-04-12 修回日期:2022-09-11)

(编辑:陈宏)