

基于指纹图谱和多成分含量测定的心脉安片质量评价研究



吴双凤^{1,2}, 张薇^{1,3}, 孙晓波³, 王德勤¹, 郭海彪¹, 刘晓秋²

1. 广州白云山和记黄埔中药有限公司 (广州 510515)
2. 沈阳药科大学中药学院 (沈阳 110016)
3. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所 (北京 100193)

【摘要】目的 采用 HPLC 构建心脉安片的指纹图谱及多种有效成分的含量测定方法。**方法** 构建 11 批心脉安片的 HPLC 指纹图谱, 同时进行相似度评价, 对数据结果进行化学计量学分析, 选出心脉安片的差异性化学成分, 并测定芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 6 种化学成分的含量。**结果** 11 批心脉安片指纹图谱有 37 个共有峰, 指认出芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、隐丹参酮等 19 个色谱峰, 涵盖复方中人参、丹参、黄芪、赤芍 4 味药材, 相似度均在 0.90 以上。聚类分析、主成分分析均将 11 批心脉安片分为 2 类, S1~S3 为一类, S4~S11 为一类; 正交偏最小二乘法判别分析标记出心脉安片中的 18 个差异性成分。测定差异较大且含量较高的成分, 6 种成分分别在 4.864~194.600、0.490~19.590、40.330~1 613.000、4.980~199.200、1.221~48.880、12.560~502.400 μg/mL 范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9999$)。3 批心脉安片中芍药苷 (赤芍)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (黄芪)、丹酚酸 B (丹参)、隐丹参酮 (丹参)、丹参酮 I (丹参) 和丹参酮 II_A (丹参) 的含量分别为 1.63~1.68、0.19、19.18~19.42、1.44~1.46、0.98~1.02、2.21~2.29 mg/g。**结论** 建立的心脉安片 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别法及多种有效成分含量分析方法全面系统稳定可行, 为心脉安片整体质量评价及质量标准提高提供了参考。

【关键词】 心脉安片; 高效液相色谱; 指纹图谱; 化学计量学; 含量测定; 芍药苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 丹酚酸 B; 隐丹参酮; 丹参酮 I; 丹参酮 II_A

【中图分类号】 R286.0

【文献标识码】 A

Quality evaluation of Xinmai'an tablets based on fingerprint and multi-component determination

WU Shuangfeng^{1,2}, ZHANG Wei^{1,3}, SUN Xiaobo³, WANG Deqin¹, GUO Haibiao¹, LIU Xiaoqiu²

1. Hutchison Whampoa Guangzhou Bai Yunshan Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Corresponding authors: ZHANG Wei, Email: 13555864346@163.com; LIU Xiaoqiu, Email: liuxiaoqiu3388@126.com

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202410047

基金项目: 广州市科技计划项目 (20212210006)

通信作者: 张薇, 博士, 高级工程师, Email: 13555864346@163.com

刘晓秋, 博士, 教授, 博士研究生导师, Email: liuxiaoqiu3388@126.com

【Abstract】Objective To establish HPLC fingerprint and multi-component determination method of Xinmai'an tablets. **Methods** The HPLC fingerprints of 11 batches of Xinmai'an tablets were established and the similarity evaluation was conducted. The chemometric analysis was performed on the data to identify the different components of Xinmai'an tablets. The contents of six chemical components, including paeoniflorin, calycosin-7-*O*- β -*D*-glucoside, salviolic acid B, cryptotanshinone, Tanshinone I and Tanshinone II_A were also determined. **Results** The HPLC fingerprints of 11 batches of Xinmai'an tablets showed 37 common peaks, among which 19 chromatographic peaks were identified, including paeoniflorin, calycosin-7-*O*- β -*D*-glucoside, cryptotanshinone, etc, representing four herbs in the formula: Ginseng radix et rhizoma, Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma, Astragali radix, and Paeoniae radix rubra. The similarity indices of 11 batches of Xinmai'an tablets were all above 0.90. The 11 batches of Xinmai'an tablets were divided into two categories by cluster analysis and principal component analysis. S1-S3 were in one group and S4-S11 were in the other group. 18 different components in Xinmai'an tablets were screened by orthogonal partial least-squares discrimination analysis. The components with large differences and high concentrations of Xinmai'an tablets were determined. Six components showed a good linear relationship with the peak area in the range of 4.864-194.600, 0.490-19.590, 40.330-1 613.000, 4.980-199.200, 1.221-48.880 and 12.560-502.400 $\mu\text{g/mL}$ ($r \geq 0.999 9$), respectively. The contents of paeoniflorin (Paeoniae radix rubra), calycosin-7-*O*- β -*D*-glucoside (Astragali radix), salviolic acid B (Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma), cryptotanshinone (Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma), tanshinone I (Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma), and tanshinone II_A (Salviae miltiorrhizae radix et rhizoma) were 1.63-1.68, 0.19, 19.18-19.42, 1.44-1.46, 0.98-1.02 and 2.21 2.29 mg/g in 3 batches of Xinmai'an tablets, respectively. **Conclusion** The established HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition method and the multi-component determination method for Xinmai'an tablets are comprehensive, systemic, stable, and workable, providing a reference for the overall quality evaluation and improvement of quality standards for Xinmai'an tablets.

【Keywords】 Xinmai'an tablets; High performance liquid chromatography; Fingerprint; Chemometrics; Content determination; Paeoniflorin; Calycosin-7-*O*- β -*D*-glucoside; Salviolic acid B; Cryptotanshinone; Tanshinone I; Tanshinone II_A

心脉安片原名结代停片，由人参、黄芪、丹参、麦冬、赤芍、冰片 6 味药组成，多药共奏益气养阴，活血化瘀，复脉定悸之功，临床用于心悸气阴两虚兼心血瘀阻证（轻中度冠心病室性早搏），症见疲惫乏力、胸闷胸痛、气短、心悸、舌红苔少、脉结、代或促^[1]。现代药理学研究表明心脉安片能调节动作电位时程与有效不应期的比值（action potential duration 90/effective refractory period, APD₉₀/ERP），使其小于 1；且能对抗乌头碱、氯化钡、氯仿及结扎冠脉等所诱导的心律失常，发挥保护心律失常的作用^[1-3]。多项临床试验也证明心脉安片能明显减少冠心病室性早搏患者室性早搏的次数，疗效确切^[4-6]。心脉安片发挥药效的主要成分有萜类（主要是三萜皂苷类）、苯丙素类、醌类、黄酮类等成分^[7]。目前执行的国家药品标准 YBZ12852004-2009Z8^[8] 以丹参药

材中丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 的含量来评价心脉安片的质量，但仅使用单一药材的指标成分无法全面评价其质量。因此，建立一种整体、全面的心脉安片质量控制方法具有重要的意义。

指纹图谱可客观反应药材或复方的整体性^[9]。本研究借助指纹图谱这一整体质量评价手段，应用 HPLC 构建心脉安片的指纹图谱，采用数据进行相似度评价反映心脉安片内在有效成分信息，运用层次聚类分析（cluster analysis, CA）以及主成分分析（principal component analysis, PCA）对 11 批次心脉安片进行综合评估，再通过正交偏最小二乘法判别分析（orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA）对 11 批心脉安片进行差异分析。基于指纹图谱及化学模式识别法建立了其中 6 种成分的含量分析方法，为其评价及质量标准提高提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Agilent 1290 高效液相色谱仪, 包括 1290infinity II 进样系统 (美国安捷伦科技有限公司); Waters 2695 高效液相色谱仪, 包括 Waters e2695 进样系统 (美国沃特世科技有限公司); CP225D 型十万分之一、BT214D 型万分之一、MSA6.6S 百万分之一电子天平均购自德国赛多利斯公司; KQ-600VDB 型台式双频数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Genie U12 超纯水仪 (上海乐枫生物科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

心脉安片 11 个批次, 由广州白云山和记黄埔中药有限公司生产, S1~S11 对应批号依次为 G21A001、G21A002、G210003、160501、160502、160503、170401、180101、180301、190501、190601, 规格: 0.32 g/片; 对照品: 芒柄花苷 (Chemfaces 公司, 批号: CFS202102, 纯度 >98%); 芍药苷 (批号: 110736-202044, 纯度 >94%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号: 111920-201907, 纯度 >94%)、迷迭香酸 (批号: 111871-202007, 纯度 >94%)、苯甲酸 (批号: 100419-201703, 纯度 >94%)、人参皂苷 Rg₁ (批号: 110703-202034, 纯度 >94%)、丹酚酸 B (批号: 111562-201917, 纯度 >94%)、隐丹参酮 (批号: 110852-201807, 纯度 >94%)、丹参酮 II_A (批号: 110766-202022, 纯度 >94%)、人参皂苷 Rf (批号: 111719-201806, 纯度 >94%) 均购自中国食品药品检定研究院; 苯甲酰芍药苷 (批号: 4633, 纯度 >96%)、人参皂苷 Rc (批号: 8799, 纯度 >96%)、二氢丹参酮 I (批号: 9112, 纯度 >96%)、丹参酮 I (批号: 5911, 纯度 >96%)、紫草酸 (批号: 10406, 纯度 >96%) 均购于上海诗丹德标准技术服务有限公司; 人参皂苷 Re (批号: RSF-R02001906001, 纯度 >98%)、人参皂苷 Rb₁ (批号: RSF-R01201907001, 纯度 >98%)、新隐丹参酮 (批号: RDD-X08502105031, 纯度 >98%) 均购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 丹酚酸 A (成都曼斯特生物科技有限公司, 批号: MUST-18022805, 纯度 99.07%); 乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯, 氨水、正丁醇、乙醇均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱研究

2.1.1 HPLC 色谱条件

采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.1% 磷酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~15 min, 15% B; 15~30 min, 15%~21% B; 30~55 min, 21%~24% B; 55~80 min, 24%~44% B; 80~120 min, 44%~72% B; 120~130 min, 72%~95% B); 检测波长为 270 nm (制备方法 1) 和 203 nm (制备方法 2); 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 20℃; 进样量为 10 μL。

2.1.2 溶液的制备

①混合对照品溶液。精密称取 19 种对照品适量, 加入甲醇进行溶解, 分别制成每 1 mL 含芍药苷 0.062 mg、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.060 mg、苯甲酸 0.183 mg、迷迭香酸 1.201 mg、芒柄花苷 0.606 mg、紫草酸 0.404 mg、人参皂苷 Rg₁ 0.121 mg、人参皂苷 Re 0.121 mg、丹酚酸 B 0.096 mg、丹酚酸 A 0.537 mg、苯甲酰芍药苷 0.524 mg、人参皂苷 Rf 0.518 mg、人参皂苷 Rb₁ 0.121 mg、人参皂苷 Rc 0.533 mg、二氢丹参酮 I 0.526 mg、新隐丹参酮 0.514 mg、隐丹参酮 0.531 mg、丹参酮 I 0.108 mg 和丹参酮 II_A 0.020 mg 的混合对照品溶液, 4℃ 保存备用。

②供试品溶液。制备方法 1: 取 1 g 心脉安片药粉, 加入 70% 甲醇溶液 50 mL, 称重, 超声 (功率: 240 W, 频率: 45 kHz) 提取 0.5 h, 放至室温, 再次称重, 并用 70% 甲醇溶液补足失重, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

制备方法 2: 取 1 g 心脉安片药粉, 加 80 mL 水, 超声 (功率: 240 W, 频率: 45 kHz) 提取 0.5 h, 滤过, 分 3 次共加 120 mL 水饱和正丁醇萃取, 取上层溶液分 2 次共加 80 mL 氨试液萃取; 取上层溶液蒸干后, 用甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 即得。

③阴性样品溶液。分别取缺人参、丹参、黄芪、赤芍、麦冬或冰片的 6 个阴性样品, 按供试品溶液制备方法制成心脉安片缺人参、心脉安片缺丹参、心脉安片缺黄芪、心脉安片缺赤芍、心脉安片缺麦冬、心脉安片缺冰片共 12 个阴性样品溶液。

2.1.3 方法学考察

①精密度试验。取供试品溶液（批号：G21A001），按“2.1.1”项下色谱条件连续进样6次，记录色谱图。运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）数据分析软件进行评估，制备方法1和制备方法2的S1样品相似度均为1.000，结果表明仪器精密度良好。

②重复性试验。取同一批次（批号：G21A001）心脉安片6份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）数据分析软件进行评价，制备方法1的S1样品相似度均 >0.998 ，制备方法2的S1样品相似度均 >0.906 ，表明该方法重复性良好。

③稳定性试验。取供试品溶液（批号：

G21A001），分别于0、2、4、8、10、24、48 h时按“2.1.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图，运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）数据分析软件进行评价，制备方法1的S1样品相似度均为1.000，制备方法2的S1样品相似度均 >0.999 ，结果表明供试品溶液在48 h内稳定性良好。

2.1.4 指纹图谱的建立及相似度评价

①指纹图谱的建立。按“2.1.2”项下方法制备11批供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。将指纹图谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）进行数据分析，以心脉安片（编号：S1）样品为本研究参照图谱，经过数据分析后，共标定37个共有峰，其中制备方法1为15个共有峰，制备方法2为22个共有峰，具体见图1和图2。

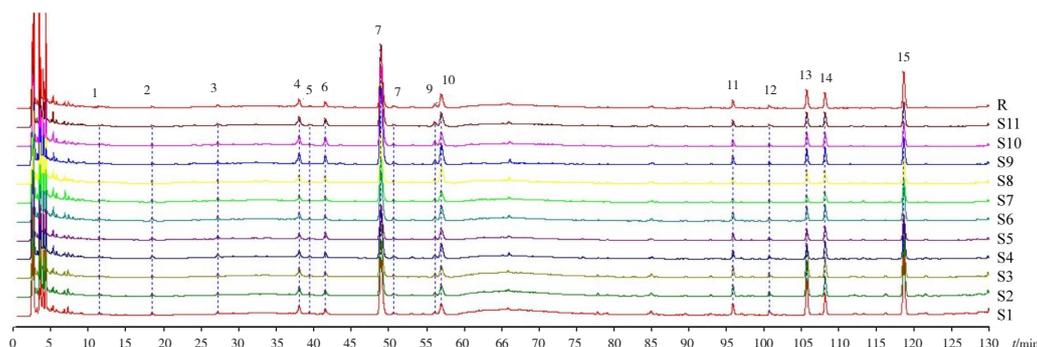


图1 心脉安片HPLC指纹图谱（制备方法1）

Figure 1. HPLC fingerprint of Xinmai'an tablets (preparation method 1)

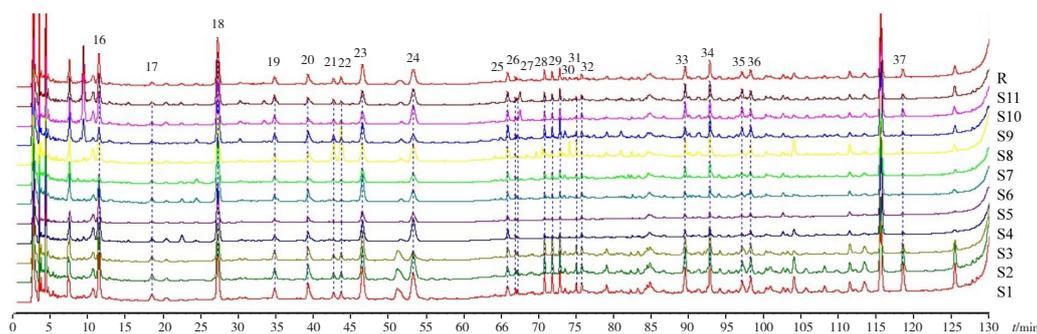


图2 心脉安片HPLC 指纹图谱（制备方法2）

Figure 2. HPLC fingerprint of Xinmai'an tablets (preparation method 2)

②共有峰的指认。经与化学对照品的紫外光谱图及共有峰的保留时间对比，总计指认出19个成分，覆盖处方中4味中药。其中1号峰为芍药苷，2号峰为毛蕊异黄酮葡萄糖苷，4号峰为迷迭香酸，6号峰为紫草酸，7号峰为丹酚酸B，10号峰为丹酚酸A，11号峰为二氢丹参酮I，13

号峰为隐丹参酮，14号峰为丹参酮I，15号峰为丹参酮II_A，18号峰为苯甲酸，20号峰为芒柄花苷，21号峰为人参皂苷R_{g1}，22号峰为人参皂苷Re，25号峰为苯甲酰芍药苷，27号峰为人参皂苷Rf，28号峰为人参皂苷Rb₁，29号峰为人参皂苷Rc，36号峰为新隐丹参酮，具体见图3和图4。

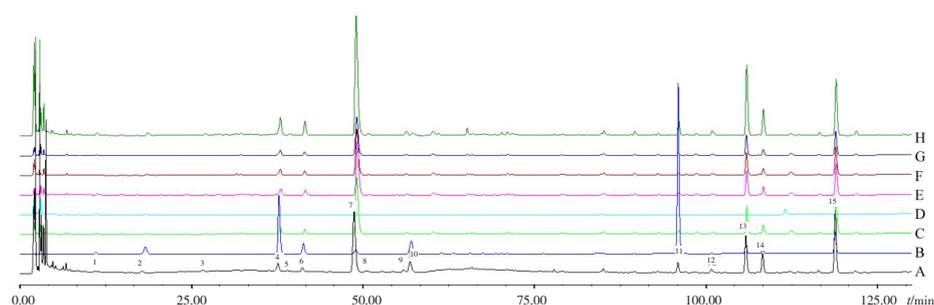


图3 心脉安片指纹图谱特征峰归属 (制备方法1)

Figure 3. Assignment of characteristic peaks in the fingerprint of Xinmai'an tablets (preparation method 1)

注: A. 供试品溶液; B. 混合对照品溶液; C. 缺人参阴性样品溶液; D. 缺丹参阴性样品溶液; E. 缺黄芪阴性样品溶液; F. 缺赤芍阴性样品溶液; G. 缺麦冬阴性样品溶液; H. 缺冰片阴性样品溶液; 1. 芍药苷; 2. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 4. 迷迭香酸; 6. 紫草酸; 7. 丹酚酸B; 10. 丹酚酸A; 11. 二氢丹参酮I; 13. 隐丹参酮; 14. 丹参酮I; 15. 丹参酮II_A。

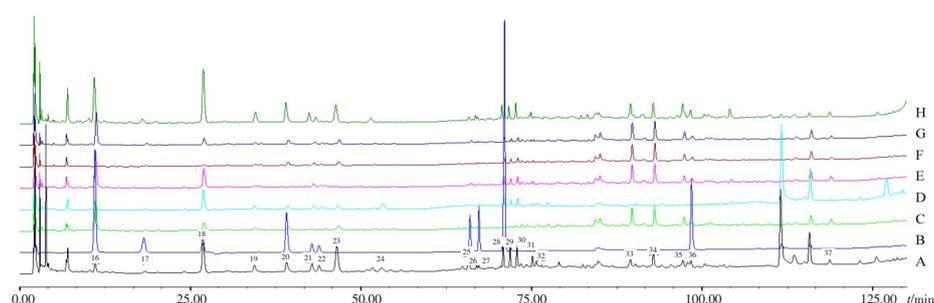


图4 心脉安片指纹图谱特征峰归属 (制备方法2)

Figure 4. Assignment of characteristic peaks in the fingerprint of Xinmai'an tablets (preparation method 2)

注: A. 供试品溶液; B. 混合对照品溶液; C. 缺人参阴性样品溶液; D. 缺丹参阴性样品溶液; E. 缺黄芪阴性样品溶液; F. 缺赤芍阴性样品溶液; G. 缺麦冬阴性样品溶液; H. 缺冰片阴性样品溶液; 18. 苯甲酸; 20. 芒柄花苷; 21. 人参皂苷R_g; 22. 人参皂苷R_e; 25. 苯甲酰芍药苷; 27. 人参皂苷R_f; 28. 人参皂苷R_b; 29. 人参皂苷R_c; 36. 新隐丹参酮。

2.1.5 共有峰的归属

通过将阴性样品溶液和供试品溶液的 HPLC 色谱图进行比较,对指纹图谱共有峰进行药材归属。19号峰为6味药的共有峰,21、22、27、28、29、30、31号峰来自人参,4、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、26、33、34、35、36、37号峰来自丹参,2、5、17、20、23、24、32号峰来自黄芪,1、3、16、18、25号峰来自赤芍,表明药材和制剂之间的相关性良好。

2.1.6 指纹图谱相似度评价

通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)数据分析软件计算11批心脉安片指纹图谱数据的相似度,结果见表1。制备方法1的11批心脉安片的相似度均在0.96以上,制备方法2的11批心脉安片的相似度均在0.90以上,说明心脉安片各批次之间相似度良好,质量较稳定。

2.2 化学模式识别

2.2.1 CA

以11批心脉安片的37个共有峰的峰面积为变量,采用组间连接法,以平方欧氏距离作为度

量标准进行CA,结果见图5。11批心脉安片样品共聚为3类(平方欧氏距离为20时):S1~S3聚为第1类;S4~S7、S9~S11聚为第2类;S8单独聚为第3类。11批心脉安片样品共聚为2类(平方欧氏距离为25时):S1~S3聚为第2类;S4~S11聚为第3类。2021年的样品聚成一类,其他年份的样品聚成一类,表明通过HCA可区分出不同品质的药品。

表1 心脉安片样品相似度评价结果

Table 1. Results of sample similarity evaluation of

Xinmai'an tablets		
编号	制备方法1	制备方法2
S1	0.964	0.927
S2	0.966	0.951
S3	0.966	0.963
S4	0.993	0.951
S5	0.993	0.958
S6	0.995	0.932
S7	0.993	0.953
S8	0.988	0.903
S9	0.979	0.937
S10	0.971	0.981
S11	0.971	0.986

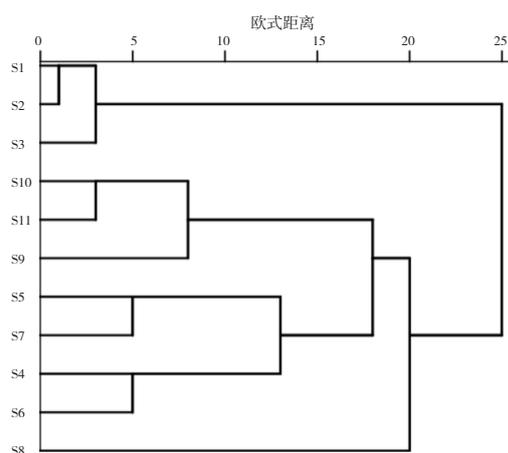


图5 11批心脉安片聚类分析树状图

Figure 5. Dendrogram of hierarchical clustering analysis of 11 batches of Xinmai'an tablets

2.2.2 PCA

以 11 批样品 × 37 个峰的峰面积为数据矩阵 (11 × 37)，运用 SIMCA 14.1 软件对 11 批心脉安片进行 PCA，选取的前 4 个主成分能够反映心脉安片的客观信息，其累积方差贡献率已达到 86.918%，图 6 为 PCA 得分图。PCA 分析将 11 批样品分为 2 类，结果与 HCA 分析结果基本一致，也进一步验证了 HCA 的分类结果。根据变量和原点之间的距离判定变量对主成分的权重影响，对主成分的影响权重越大的变量越偏离原点^[10-11]。由载荷散点图 (图 7) 分析得到 3、13 (隐丹参酮)、28 (人参皂苷 Rb₁)、29 (人参皂苷 Rc) 号色谱峰对主成分 1 的贡献较大，2 (毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、6、7 (丹酚酸 B) 号色谱峰对主成分 2 的贡献较大。

2.2.3 OPLS-DA

在 SIMCA 14.1 中导入 11 批样品的 37 个共有峰峰面积，对 11 批样品进行 OPLS-DA，此时 R^2X (X 轴方向模型的累积解释率) 为 0.732， R^2Y (Y 轴方向模型的累积解释率) 为 0.993， Q^2 (模型的累积预测率) 为 0.954，均 > 0.5 ，表示模型有较好的预测能力^[12]。11 批样品共分为 2 类 (图 8)，与 HCA 和 PCA 分类结果一致。以变量重要性投影值 (variable importance projection, VIP) > 1 为标准筛选心脉安片样品分类贡献较大的差异成分^[13]，筛选出 13 (隐丹参酮)、15 (丹参酮 II_A)、29 (人参皂苷 Rc)、12、28 (人参皂苷 Rb₁)、32、23、17、37、33、20 (芒柄花苷)、11 (二氢丹参

酮 I)、14 (丹参酮 I)、30、36 (新隐丹参酮)、9、3 和 26 号峰 (图 9)，以上色谱峰可能是各批次心脉安片样品之间产生差异的重要因素。

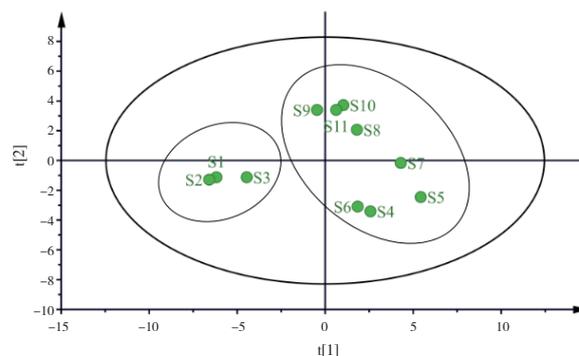


图6 11批心脉安片的PCA得分图

Figure 6. PCA score plot of 11 batches of Xinmai'an tablets

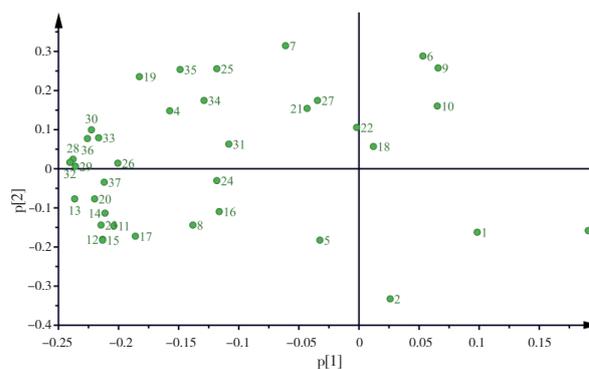


图7 11批心脉安片主成分模型载荷图

Figure 7. Loading plot of 11 batches of Xinmai'an tablets

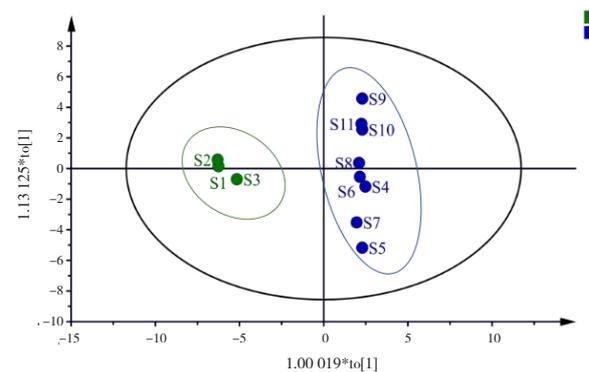


图8 11批心脉安片的OPLS-DA得分图

Figure 8. OPLS-DA score plot for 11 batches of Xinmai'an tablets

2.3 指标成分的测定

2.3.1 HPLC 色谱条件

采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)，以 0.1% 磷酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相，梯度洗

脱 (0~15 min, 17%~21% B; 15~40 min, 21%~65% B; 40~65 min, 65% B); 芍药苷检测波长为 230 nm, 其余 5 个化合物检测波长为 270 nm; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 20°C; 进样量为 10 μ L。

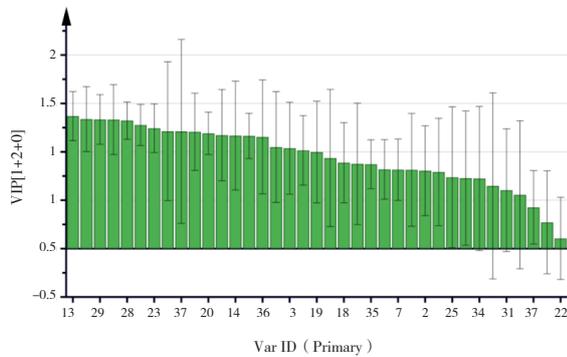


图9 心脉安片的OPLS-DA的VIP图

Figure 9. OPLS-DA VIP values of Xinmai'an tablets

2.3.2 溶液的配制

①混合对照品溶液。精密称取 6 种对照品适量, 加甲醇溶解并定容, 制得每 1 mL 分别含芍药苷 0.194 6 mg、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.019 6 mg、丹酚酸 B 1.613 2 mg、隐丹参酮 0.199 2 mg、丹参酮 I 0.048 9 mg 和丹参酮 II_A 0.502 4 mg 的混合对照品储备溶液, 4°C 保存备用。

②供试品溶液。同“2.1.2”项下供试品溶液制备方法 1。

2.3.3 方法学考察

①专属性试验。精密量取对照品溶液和供试品溶液按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 见图 10 和图 11。将供试品溶液色谱图和对照品溶液色谱图比较, 结果表明供试品中其他成分不干扰芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 的测定。

②线性关系考察。分别精密吸取“2.3.2”项下混合对照品溶液, 加甲醇稀释分别 2、5、8、10、20、40 倍, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 以各成分浓度为横坐标 (X , μ g/mL)、峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 并计算回归方程, 结果见表 2。

③精密度试验。取“2.3.2”项下混合对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 计算得芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸 B、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II_A 峰面积的 RSD

分别为 0.45%、0.79%、0.34%、0.24%、0.35% 和 0.22% ($n=6$), 结果表明仪器精密度良好。

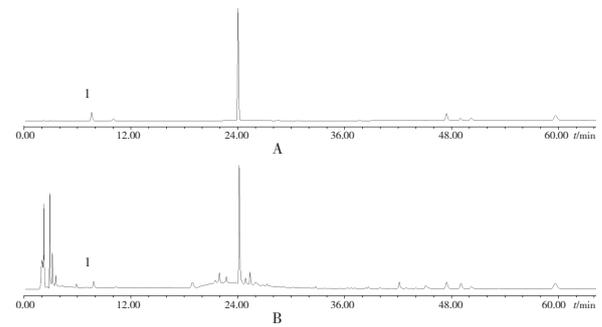


图10 HPLC含量测定色谱图 (230 nm)

Figure 10. HPLC chromatogram for content determination (230 nm)

注: A. 供试品溶液; B. 混合对照品溶液; 1. 芍药苷。

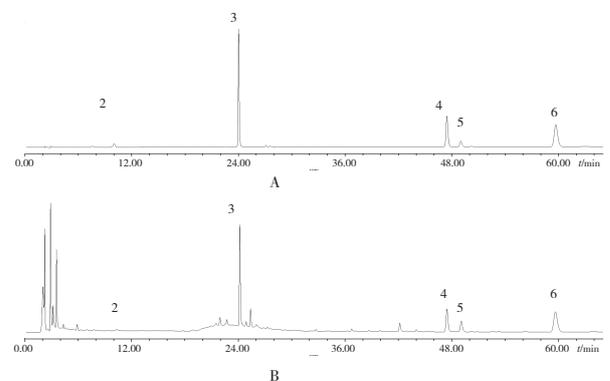


图11 HPLC含量测定色谱图 (270 nm)

Figure 11. HPLC chromatogram for content determination (270 nm)

注: A. 供试品溶液; B. 混合对照品溶液; 2. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 3. 丹酚酸B; 4. 隐丹参酮; 5. 丹参酮I; 6. 丹参酮II_A。

表2 各成分线性关系考察结果

Table 2. Linear relationship investigation results of each component

指标成分	回归方程	r	线性范围 (μ g/mL)
芍药苷	$Y=1.449 \times 10^3 X+2\ 354$	1.000 0	4.864~194.600
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=2.253 \times 10^3 X+31$	0.999 9	0.490~19.590
丹酚酸B	$Y=8\ 638 X-2.188 \times 10^5$	0.999 9	40.330~1\ 613.000
隐丹参酮	$Y=5.001 \times 10^4 X+3.190 \times 10^4$	1.000 0	4.980~199.200
丹参酮I	$Y=4.267 \times 10^4 X+124$	1.000 0	1.221~48.880
丹参酮II _A	$Y=5.445 \times 10^4 X+9.289 \times 10^4$	1.000 0	12.560~502.400

④稳定性试验。取“2.3.2”项下供试品溶液, 分别于室温放置 0、2、4、8、10、24、48 h 时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 计算得芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等 6 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.95%、0.77%、0.33%、0.25%、0.43% 和 0.21% ($n=7$), 结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

⑤重复性试验。取同一批次心脉安片 6 份, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.3.1”

项下色谱条件进样测定, 计算得芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等 6 种成分的平均含量分别为 1.664、0.1920、19.32、1.451、1.003、2.248 mg/g, *RSD* 分别为 0.45%、0.71%、0.52%、0.82%、1.6% 和 2.9% ($n=6$), 结果表明该方法重复性良好。

⑥加样回收率试验。取 6 份已测定的心脉安片约 0.5 g, 精密称定, 分别精密加入 0.804 7 mg 芍药苷对照品、0.100 5 mg 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品、9.115 0 mg 丹酚酸 B 对照品、0.708 8 mg 隐丹参酮对照品、0.417 3 mg 丹参酮 I 对照品和 1.094 0 mg 丹参酮 II_A 对照品, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.3.1”项下色谱条件

进样测定, 记录色谱峰面积并计算得芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等 6 种成分的平均回收率分别为 90.38%、86.45%、103.58%、92.87%、89.56% 和 94.81%, *RSD* 分别为 0.28%、1.6%、1.2%、0.87%、1.1% 和 1.2% ($n=6$), 结果表明该方法准确度良好。

2.3.4 样品的含量测定

取心脉安片 3 个批次, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 3 批心脉安片中芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷等 6 种成分的含量分别为 1.63~1.68、0.19、19.18~19.42、1.44~1.46、0.98~1.02 和 2.21~2.29 mg/g, 结果见表 3。

表3 各成分含量测定结果 (mg/g, $n=3$)

Table 3. Content determination results of each component (mg/g, $n=3$)

批号	芍药苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	丹酚酸B	隐丹参酮	丹参酮I	丹参酮II _A
G21A001	1.68	0.19	19.42	1.46	1.02	2.29
G21A002	1.66	0.19	19.33	1.45	0.98	2.23
G21A003	1.63	0.19	19.18	1.44	0.99	2.21

3 讨论

3.1 指纹图谱

本研究采用 HPLC 法建立了 11 批心脉安片的指纹图谱, 共标定了 37 个共有峰, 并结合阴性样品溶液进行对照, 37 个共有峰均有归属, 表明药材和制剂之间存在良好的关联性。通过与对照品进行比对, 鉴定了 19 个有效成分, 覆盖复方中人参、丹参、黄芪、赤芍 4 味药材, 能够更为全面地反映产品的质量信息。以两种制备方法制备的各批次间样品相似度均大于 0.90, 说明 11 批心脉安片的相似度良好, 各批次间质量差异较小。研究发现 HCA 和 PCA 分析均将 11 批心脉安片分成 2 类, 2021 年生产的药品为一类, 其他年份生产的药品为另一类, 两者结果相互印证, 心脉安片有效期为 24 个月, 提示不同年份的样品稳定性存在一定差异, 心脉安片有效期设置合理。OPLS-DA 分析 VIP 图得出 13 (隐丹参酮)、15 (丹参酮 II_A)、29 (人参皂苷 R_c)、12、28 (人参皂苷 R_{b1})、32、23、17、37、33、20 (芒柄花苷)、11 (二氢丹参酮 I)、14 (丹参酮 I)、30、36 (新隐丹参酮)、9、3、26 号峰等可能是导致心脉安片差异的化学成分。本研究采用指纹图谱技术和化学模式识别技术结合的方法, 能更加客观全面地评价心脉安片质量, 可为进一步的多成分含量测定提供参考。

3.2 指标成分的测定

3.2.1 色谱条件筛选

分别考察了 0.8、1.0、1.2 mL/min 3 种不同流速及 20、25、30、35 °C 4 种柱温, 结果显示流速对有效成分的流出和含量影响较小; 20 °C 柱温时, 两种丹参酮 (隐丹参酮和丹参酮 I) 的分离程度最理想。试验前期考察了来自 2 个厂家生产的高效液相色谱仪 (Agilent 1290 高效液相色谱仪、Waters 2695 高效液相色谱仪) 和来自 3 个厂家生产的色谱柱 [Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Wonderasil Superb-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、zafex Supfex Jx-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)] 的分离效果及有效成分含量, 更换不同的仪器和不同的色谱柱, 结果显示样品有效成分的分离度均大于 1.5, 且含量的 *RSD* 小于 2.0%, 说明该含量测定方法耐用性好。

3.2.2 提取条件考察

分别考察了 20%、50%、70%、100% 的甲醇和 20%、50%、70%、100% 的乙醇为提取溶剂对心脉安片有效成分提取的影响, 综合出峰数量和有效成分含量, 确定 70% 甲醇为提取溶剂。

3.2.3 指标成分确定

中药复方化学物质成分十分复杂, 其药效的发挥是多种类化学物质协同作用的结果。心脉安片含有大量具有心血管保护作用的药效成分, 丹

参酮 I、芍药苷、隐丹参酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、丹酚酸 B、丹参酮 II_A 等成分通过抗炎、抗细胞凋亡、抗氧化等机制发挥保护心肌的作用,防治心律失常和心力衰竭^[14-19]。基于指纹图谱和化学模式识别结果及文献报道,建立能够全面综合反映心脉片质量的分析方法,本文选择芍药苷(赤芍)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(黄芪)、丹酚酸 B(丹参)、隐丹参酮(丹参)、丹参酮 I(丹参)和丹参酮 II_A(丹参)6种指标成分进行心脉安片成分含量测定分析,指标选择客观合理,在国家药品标准 YBZ12852004-2009Z(丹参酮 II_A和丹酚酸 B)基础上进一步完善,有利于心脉安片的质量控制和进一步深入研究。

3.2.4 结果分析

本试验采用 HPLC 法建立了心脉安片的指纹图谱,确定共有峰 37 个,共指认 19 种成分,覆盖心脉安片中 4 味药材,各批次样品之间稳定性较好,结合化学模式识别技术发现不同年份的心脉安片存在一定差异,其中丹参酮类等成分为导致差异的主要成分,在此基础上,建立了芍药苷(赤芍)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(黄芪)、丹酚酸 B(丹参)、隐丹参酮(丹参)、丹参酮 I(丹参)和丹参酮 II_A(丹参)6种指标成分的含量测定方法,该方法全面系统,稳定可行,重现性好,为心脉安片的质量标准提升奠定了研究基础。

参考文献

- 张薇,李楚源,王德勤,等.心脉安的UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS定性分析和UHPLC-QTRAP-MS/MS含量测定[J].中草药,2023,54(6):1743-1756.[Zhang W, Li CY, Wang DQ, et al. Identification of chemical constituents of Xinmai'an by UHPLC-Q-ExactiveOrbitrap-MS and determination of its content by UHPLC-QTRAP-MS/MS[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2023, 54(6): 1743-1756.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.006.
- 许实波,项辉,李锐.中成药结代停对豚鼠心肌细胞动作电位的影响[J].中山大学学报论丛,1994,1(6):115-117.[Xu SB, Xiang H, Li R. Effect of Chinese medicine jedaiting on action potential of isolated guinea pig cardiac muscle cell[J]. Supplement to the journal of Sun Yatsen university, 1994, 1(6): 115-117.] <https://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTOTAL-ZSDL199406020.htm>.
- 李锐,廖惠芳,廖习珍,等.结代停药效学研究[J].中药药理与临床,1997,13(1):31-35.[Li R, Liao HF, Liao XZ, et al. A study on pharmacodynamics of Jiedaiting[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 1997, 13(1): 31-35.] DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.1997.01.012.
- 邱晓军,邓国忠.心脉安片治疗冠心病室性早搏40例疗效观察[J].成都中医药大学学报,2003,26(1):23-25.[Qiu XJ, Deng GZ. Clinical trial of Xinmai'an tablets in the treatment of ventricular premature bearing in 40 cases of coronary heart disease[J]. Journal of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2003, 26(1): 23-25.] DOI: 10.13593/j.cnki.51-1501/r.2003.01.010.
- 邵雪松.心脉安片治疗冠心病室性早搏临床观察[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(9):183-185.[Shao XS. Clinical observation on Xinmai'an in treatment of ventricular premature due to coronary heart disease[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2013, 15(9): 183-185.] DOI: 10.13194/j.issn.1673-842x.2013.09.022.
- 李玉峰,鲁卫星.心脉安片治疗冠心病室性早搏40例临床观察[J].北京中医药大学学报,2003,26(3):67-69.[Li YF, Lu WX. Clinical trial of Xinmai'an tablets in the treatment of ventricular premature bearing in 40 cases of coronary heart disease[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2003, 26(3): 67-69.] DOI: 10.3321/j.issn.1006-2157.2003.03.023.
- 吴双凤,张薇,郭海彪,等.基于网络药理学及分子对接探讨心脉安片“异病同治”心律失常和心力衰竭的作用机制[J].特产研究,2024,46(4):31-41.[Wu SF, Zhang W, Guo HB, et al. Study on the mechanism of Xinmai'an tablets in treating arrhythmia and heart failure with concept of "treating different diseases with same method" based on network pharmacology and molecular docking[J]. Special Wild Economic Animal and Plant Research, 2024, 46(4): 31-41.] DOI: 10.16720/j.cnki.tcyj.2023.098.
- 国家食品和药品监督管理局.国家药品标准.YBZ12852004-2009Z[S].2009.
- 车贵娟,匡艳辉,刘晓秋,等.指纹图谱及多成分定量结合化学模式识别法评价不同厂家消炎利胆片质量[J].世界科学技术-中医药现代化,2022,24(11):4245-4252.[Che GJ, Kuang YH, Liu XQ, et al. Quality evaluation of Xiaoyanlidan tablets from different habitats by fingerprint and multi-component quantification combined with chemical pattern recognition[J]. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2022, 24(11): 4245-4252.] DOI: 10.11842/wst.20211222001.
- 刘慧,肖金超,张庆捷,等.金骨莲胶囊HPLC指纹图谱及化学模式识别研究[J].中草药,2021,52(14):4185-4192.[Liu H, Xiao JC, Zhang QJ, et al. VHPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Jingulian capsules[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(14): 4185-4192.] DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.14.008.
- 吕渭升,李振雨,侯栩轩,等.基于UPLC指纹图谱和化学计量学评价不同产地青蒿药材质量[J].中国中医药信息杂志,2023,30(3):107-113.[Lyu WS, Li ZY, Hou XX, et al. Quality evaluation of medicinal herbs of different origins of Artemisiae annuae herba based on UPLC fingerprint and chemometrics[J]. Chinese Journal

- of Information on Traditional Chinese Medicine, 2023, 30(3): 107–113.] DOI: [10.19879/j.cnki.1005-5304.202207064](https://doi.org/10.19879/j.cnki.1005-5304.202207064).
- 12 韩晴雯, 周斌, 李玉平, 等. HPLC 指纹图谱技术结合模式识别分析评价参莲胶囊的质量 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(7): 1300–1308. [Han QW, Zhou B, Li YP, et al. Quality evaluation of Shenlian capsules by HPLC fingerprint and pattern recognition[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2020, 40(7): 1300–1308.] DOI: [10.16155/j.0254-1793.2020.07.19](https://doi.org/10.16155/j.0254-1793.2020.07.19).
- 13 朱明娟, 邝国俊, 高巍, 等. 毛冬青 HPLC-UV 指纹图谱与化学模式识别 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(6): 1182–1187. [Zhu MJ, Kuang GJ, Gao W, et al. HPLC-UV fingerprints and chemical pattern recognition of *Ilicis Pubescentis Radix*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(6): 1182–1187.] DOI: [10.19540/j.cnki.cjzmm.2018.0043](https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjzmm.2018.0043).
- 14 Tsai CC, Wu HH, Chang CP, et al. Calycosin-7-O- β -D-glucoside reduces myocardial injury in heat stroke rats[J]. J Formos Med Assoc, 2019, 118(3): 730–738. DOI: [10.1016/j.jfma.2018.08.024](https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.08.024).
- 15 罗红, 王春花, 赵玲璐, 等. 丹酚酸 B 抗心肌纤维化的机制研究 [J]. 中国药房, 2017, 28(28): 3900–3903. [Luo H, Wang CH, Zhao LL, et al. Study on the mechanism of anti-myocardial fibrosis of salvianolic acid B[J]. China Pharmacy, 2017, 28(28): 3900–3903.] DOI: [10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.04](https://doi.org/10.6039/j.issn.1001-0408.2017.28.04).
- 16 丁晓彦. 丹参脂溶性成分谱—效相关数学模型的研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2014. <https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10441-1015660175.htm>.
- 17 Qiao P, Xu J, Liu X, et al. Tanshinone IIA improves ventricular remodeling following cardiac infarction by regulating miR-205-3p[J]. Dis Markers, 2021, 2021: 8740831. DOI: [10.1155/2021/8740831](https://doi.org/10.1155/2021/8740831).
- 18 Zhang Y, Luo F, Zhang H, et al. Cryptotanshinone ameliorates cardiac injury and cardiomyocyte apoptosis in rats with coronary microembolization[J]. Drug Dev Res, 2021, 82(4): 581–588. DOI: [10.1002/ddr.21777](https://doi.org/10.1002/ddr.21777).
- 19 Zhuo Y, Yuan R, Chen X, et al. Tanshinone I exerts cardiovascular protective effects *in vivo* and *in vitro* through inhibiting necroptosis via Akt/Nrf2 signaling pathway[J]. Chin Med, 2021, 16(1): 1–15. DOI: [10.1186/s13020-021-00458-7](https://doi.org/10.1186/s13020-021-00458-7).
- 收稿日期: 2024 年 10 月 22 日 修回日期: 2024 年 12 月 09 日
本文编辑: 钟巧妮 李 阳