中图分类号：R932；R284.1；R286.0　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)19－0095－07
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.19.020

基于高效液相色谱指纹图谱和多成分定量的大蓟配方颗粒质量评价*

丁富娟[1]，刘　斌[1△]，赵海燕[1]，张　明[1]，张力伟[1]，王煦辰[1]，张军鹏[1]，孔令红[2]

（1. 山东省泰安市食品药品检验检测研究院，山东 泰安　271000；2. 山东省泰安市岱岳区疾病预防控制中心，山东 泰安　271000）

摘要：目的　评价不同生产企业不同批次大蓟配方颗粒的质量。**方法**　采用高效液相色谱（HPLC）法测定大蓟配方颗粒中 5 种有效成分的含量，色谱柱为 Agilent Extend C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈－甲醇（4∶1，*V*/*V*）－0.1% 磷酸溶液（梯度洗脱），流速为 1.0 mL/min，检测波长为 330 nm，柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL；建立指纹图谱，通过比对鉴定共有峰，并进行相似度评价，采用聚类分析法（CA）、主成分分析（PCA）法和正交偏最小二乘判别分析（OPLS－DA）法对 5 个生产企业的 17 批样品进行分析。**结果**　大蓟配方颗粒的指纹图谱有 14 个共有峰，指认出了 8 个峰；CA 和 PCA 将 17 批大蓟配方颗粒分为 4 类；OPLS－DA 确定了 6 种差异标志物成分，对其影响显著性排序分别为芹菜素－7－*O*－葡萄糖醛酸苷＞峰 7＞绿原酸＞峰 9＞隐绿原酸＞柳穿鱼叶苷。5 种成分在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好（$r \geq 0.999\ 1$，$n = 5$）；平均加样回收率为 95.88%～99.12%，*RSD* 为 1.40%～2.00%（$n = 9$）。**结论**　该方法操作简单，方法学考察结果良好，能用于大蓟配方颗粒的质量评价。

关键词：大蓟配方颗粒；高效液相色谱指纹图谱；多成分定量；聚类分析法；主成分分析法；正交偏最小二乘判别分析法

Quality Evaluation of Cirsium Japonicum Formula Granules Based on HPLC Fingerprints and Multi－Components Determination

DING Fujuan[1], LIU Bin[1], ZHAO Haiyan[1], ZHANG Ming[1], ZHANG Liwei[1], WANG Xuchen[1], ZHANG Junpeng[1], KONG Linghong[2]

(1. Tai'an Testing Institute for Food and Drug Control, Tai'an, Shandong, China　271000; 2. Daiyue District Center for Disease Control and Prevention, Tai'an, Shandong, China　271000)

Abstract: Objective　To evaluate the quality of different batches of Cirsium Japonicum Formula Granules (CJFG) from different manufacturers. **Methods**　High－performance liquid chromatography (HPLC) method was used for the content determination of five active ingredients in CJFG, the chromatographic column was Agilent Extend C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile methanol (4∶1, *V*/*V*) － 0.1% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 330 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. The fingerprints of CJFG were established to identify common peaks through comparison, and evaluate similarity. Cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares－discriminant analysis (OPLS－DA) were used to analyze 17 batches of samples from five manufacturers. **Results**　The fingerprints of CJFG had fourteen common peaks, and eight peaks were identified. CA and PCA results divided 17 batches of CJFG into four categories. OPLS－DA identified six differential marker components, and the order of their significance was apigenin－7－*O*－glucuronide > peak 7 > chlorogenic acid > peak 9 > cryptochlorogenic acid > pecaalinarin. The five components had a good linear relationship with peak area within their respective mass concentration ranges ($r \geq 0.999\ 1$, $n = 5$). The average recovery rate was in the range of 95.88%－99.12%, with *RSD* of 1.40%－2.00% ($n = 9$). **Conclusion**　The method is simple, and the results of methodological investigation are good, which can be used for the quality evaluation of CJFG.

Key words: Cirsium Japonicum Formula Granules; HPLC fingerprints; multi－compontnt determination; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares－discriminant analysis

大蓟配方颗粒由菊科植物蓟 *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC. 的干燥地上部分经炮制并加工制成的配方颗粒，具有凉血止血、散瘀解毒消痈功效[1]。大蓟化学成分主要有黄酮及其苷类、三萜和甾醇类、木脂素类、有机酸类、酚类化合物等[2－5]，国家药品标准《大蓟配方颗粒》含量测定项规定了柳穿鱼叶苷的含量，但仅通过单一成分的定量难以控制大蓟配方颗粒的质量。指纹图谱联合化学计量学分析药物的整体质量为中药的质

*基金项目：山东省食品药品监督管理局 2022 年药品质量安全风险监测项目［2022－12］。

第一作者：丁富娟，女，硕士，主管药师，研究方向为中药质量控制与药品检验，（电子信箱）dingfujuann@163.com。

△通信作者：刘斌，男，硕士，副主任药师，研究方向为药品质量控制，（电子信箱）185799841@qq.com。

量控制及分析提供了新思路[6-14]。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)指纹图谱、聚类分析(CA)法、主成分分析(PCA)法和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)法,结合多成分定量,多角度评价不同生产企业的不同批次大蓟配方颗粒的质量,为其质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT型液相色谱仪(日本Shimadzu公司);XS205DU型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为十万分之一);KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为40 kHz)。

1.2 试药

绿原酸对照品(批号为110753-202119,含量为96.6%),咖啡酸对照品(批号为110885-201703,含量为100.0%),地奥司明对照品(批号为101348-202203,含量为92.2%),蒙花苷对照品(批号为111528-202213,含量为95.1%),柳穿鱼叶苷对照品(批号为111728-201703,含量为99.6%),均购自中国食品药品检定研究院;新绿原酸对照品(批号为must-22040213,含量为99.55%),隐绿原酸对照品(批号为must-21082610,含量为99.88%),均购自成都曼思特生物科技有限公司;芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号为RFS-Q072110806001,含量为98.2%);乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯;大蓟配方颗粒样品(编号为S1-S17)涉及5个生产企业,样品信息见表1。

2 方法与结果

2.1 HPLC指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Extend C_{18}柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:A为乙腈-甲醇(4∶1,*V*/*V*),B为0.1%磷酸溶液,梯度洗脱(0~10 min时6%A,10~15 min时6%A→7%A,15~18 min时7%A→8%A,18~25 min时8%A→10%A,25~48 min时10%→15%A,48~70 min时15%A→25%A,70~80 min时25%A→35%A,80~86 min时35%A);流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:330 nm;进样量:10 μL。在此色谱条件下,新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷8种成分的分离度均大于1.5,色谱峰峰形良好,理论板数均大于8 000。

2.1.2 溶液制备

分别取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、地奥司明、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、蒙花苷、柳穿鱼叶苷对照品各适量,精密称定,加70%乙醇溶解,制成质量浓度分别为261.38,243.40,210.36,241.41,353.03,234.59,101.68,102.30 μg/mL的混合对照品溶液。取样品,研细,取1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%乙醇50 mL,称定质量,超声处理(功率为300 W,频率为40 kHz)40 min,取出,放冷,再称定质量,用70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

表1 大蓟配方颗粒样品信息

Tab. 1 Information of CJFG samples

编号	批号	生产企业	规格
S1	582202071	青州尧王制药有限公司	每1 g相当于饮片4 g
S2	582202070	青州尧王制药有限公司	每1 g相当于饮片4 g
S3	21032301	江阴天江药业有限公司	每1 g相当于饮片10 g
S4	21042203	江阴天江药业有限公司	每1 g相当于饮片10 g
S5	A1115080	广东一方制药有限公司	每1 g相当于饮片8.3 g
S6	2105017	四川新绿色药业科技发展有限公司	每1 g相当于饮片21.4 g
S7	2107025	四川新绿色药业科技发展有限公司	每1 g相当于饮片21.4 g
S8	21071003	山东一方制药有限公司	每1 g相当于饮片4 g
S9	20100101	山东一方制药有限公司	每1 g相当于饮片4 g
S10	G2010473	山东一方制药有限公司	每1 g相当于饮片4 g
S11	G2010483	山东一方制药有限公司	每1 g相当于饮片4 g
S12	G2010493	山东一方制药有限公司	每1 g相当于饮片4 g
S13	0105642	广东一方制药有限公司	每1 g相当于饮片8.3 g
S14	582202069	青州尧王制药有限公司	每1 g相当于饮片4 g
S15	21031933	江阴天江药业有限公司	每1 g相当于饮片10 g
S16	A1115082	广东一方制药有限公司	每1 g相当于饮片4 g
S17	2006027	四川新绿色药业科技发展有限公司	每1 g相当于饮片21.4 g

2.1.3 方法学考察

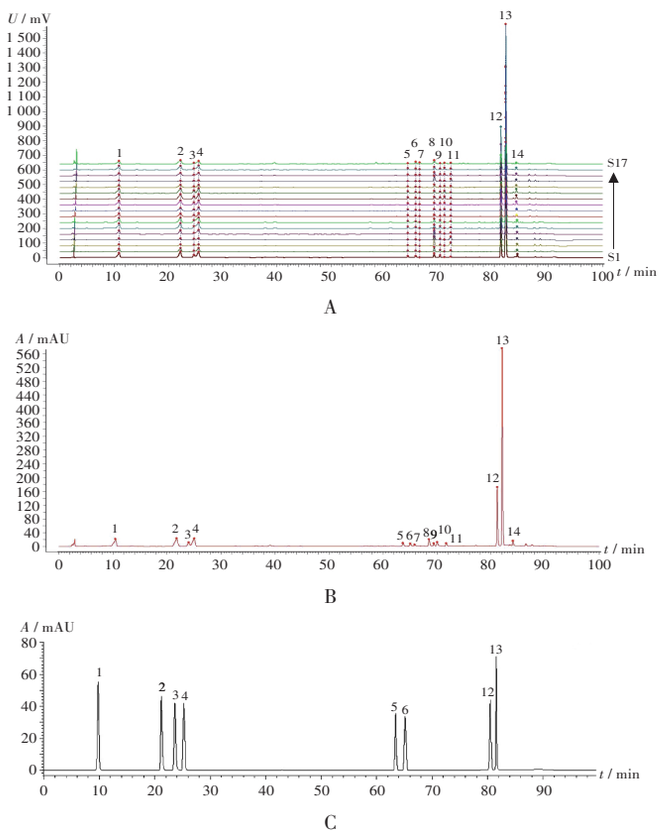
精密度试验:取样品(编号为S8)适量,精密称定,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果共有峰相对保留时间的*RSD*为0.18%~0.54%(*n*=6),相对峰面积的*RSD*为0.33%~0.95%(*n*=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(编号为S8)适量,精密称定,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件分别于0,2,4,8,12,18,24 h时进样测定,记录色谱图。结果各共有峰相对保留时间的*RSD*为0.33%~0.75%(*n*=7),相对峰面积的*RSD*为0.48%~1.24%(*n*=7),表明供试品溶液室温放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(编号为S8)适量,精密称定,按2.1.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果各共有峰相对保留时间的*RSD*为0.26%~0.58%(*n*=6),相对峰面积的*RSD*为0.62%~1.56%(*n*=6),表明方法重复性良好。

2.1.4 指纹图谱建立

指纹图谱建立与共有峰标定：取17批样品（编号为S1－S17），分别按2.1.2项下方法制备供试品溶液，按2.1.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图。将17批样品的色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版），以样品（编号为S1）为参照图谱进行全峰匹配，采用中位数法经多点校正生成共有模式指纹图谱（图1 A），以平均数法生成大蓟配方颗粒对照指纹图谱（图1 B）。柳穿鱼叶苷为大蓟的主要有效成分，在所有已知色谱峰中的峰面积最大，与相邻色谱峰分离效果好，故选择柳穿鱼叶苷色谱峰为参照峰（S），共标定出14个共有峰。



1. 新绿原酸 2. 绿原酸 3. 隐绿原酸 4. 咖啡酸 5. 地奥司明 6. 芹菜素－7－*O*－葡萄糖醛酸苷 12. 蒙花苷 13. 柳穿鱼叶苷 A. 共有模式指纹图谱 B. 对照指纹图谱 C. 混合对照品溶液高效液相色谱图

图1 高效液相色谱指纹图谱

1. Neochlorogenic acid 2. Chlorogenic acid 3. Cryptochlorogenic acid 4. Caffeic acid 5. Diosmin 6. Apigenin－7－*O*－glucuronide 12. Buddleoside 13. Pectolinarin A. Common pattern fingerprints B. Reference fingerprints C. HPLC chromatogram of the mixed reference solution

Fig. 1 HPLC fingerprints

相似度评价：采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）评价17批样品指纹图谱的相似度，结果见表2。可见，17批样品与对照指纹图谱的相似度均大于0.90，除3批样品（编号为S6－S7，S17）外，其他14批样品的相似度均大于0.98，相似度总体良好。这3批样品由同一企业生产，与其他生产企业相比有一定差异。

共有峰指认：通过比对鉴定共有峰，经混合对照品溶液HPLC图（图1 C）指认，确定峰1为新绿原酸，峰2为绿原酸，峰3为隐绿原酸，峰4为咖啡酸，峰5为地奥司明，峰6为芹菜素－7－*O*－葡萄糖醛酸苷，峰12为蒙花苷，峰13为柳穿鱼叶苷。

2.2 聚类分析

以14个共有峰为变量，采用SPSS 24.0统计学软件，以平方欧式距离为测度进行聚类分析，结果见图2。可见，当类间距为20时，17批样品聚为2类，编号为S1－S7，S13－S17的样品聚为一类，编号为S8－S12的样品聚为一类；当类间距为10时，第一类样品又聚为2类，编号为S1－S5，S13－S16的样品聚为一类，编号为S6－S7，S17的样品聚为一类；当类间距为5时，编号为S1－S2，S14的样品聚为一类，编号为S3～S5，S13，S15－S16的样品聚为一类。可见，不同生产企业间的样品质量有一定差异。

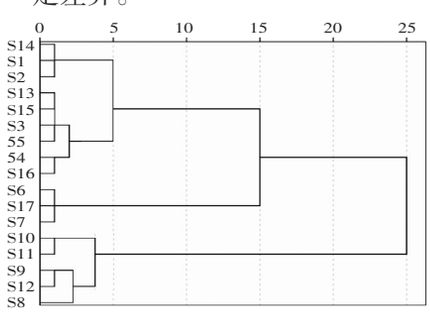


图2 聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of the cluster analysis

2.3 化学模式识别

PCA：以14个共有峰的峰面积为变量，采用PCA法对17批样品进行分析，通过SIMCA 13.0软件对归一化后的数据进行多变量统计与分析，建立PCA模型，结果见图3。其中，编号为S1－S2，S14，编号为S3－S5，S13，S15－S16，编号为S8－S12的样品相对集中，编号为S6－S7，S17的样品比较集中，与聚类分析结果基本一致。由PCA各特征峰的变量载荷图（图4）可知，变量对主成分1的影响权重大小依次为地奥司明、咖啡酸、峰14、绿原酸，变量对主成分2的影响权重大小依次为芹菜素－7－*O*－葡萄糖醛酸苷、峰7。

OPLS－DA：根据PCA结果，以14个共有峰的峰面积为变量进行OPLS－DA，建立的模型参数为R^2X = 0.99，R^2Y = 0.99，Q^2 = 0.97，均大于0.5，表明该模型预测能力和稳定性均较好。由图5可知，17批样品可分为4类，与聚类分析结果基本一致。采用变量重要性投影（VIP）值筛选差异成分，以VIP > 1为条件筛选出6个化

表 2　17 批大蓟配方颗粒相似度评价结果

Tab. 2　Similarity analysis of 10 batches of CJFG

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	R
S1	1.000	0.984	0.997	0.997	0.999	0.925	0.999	0.999	0.999	0.985	0.972	1.000	1.000	0.998	0.999	0.999	0.924	1.000
S2	0.984	1.000	0.999	0.999	0.976	0.921	0.943	0.999	0.999	0.991	0.969	0.999	1.000	0.999	0.991	0.984	0.915	1.000
S3	0.997	0.999	1.000	0.951	0.979	0.999	0.982	0.997	0.997	0.997	0.997	0.996	0.999	0.987	0.997	0.991	0.896	0.999
S4	0.997	0.999	0.951	1.000	0.987	0.998	0.917	0.996	0.997	0.997	0.997	0.996	0.999	0.984	0.992	0.987	0.895	0.999
S5	0.999	0.976	0.979	0.987	1.000	0.871	0.853	0.997	0.998	0.998	0.998	0.998	1.000	0.975	0.993	0.995	0.903	0.999
S6	0.925	0.921	0.999	0.998	0.871	1.000	0.994	0.899	0.897	0.903	0.895	0.999	1.000	0.999	0.999	0.897	0.918	0.908
S7	0.999	0.943	0.982	0.917	0.853	0.994	1.000	0.902	0.911	0.908	0.901	0.871	0.853	0.894	0.832	0.901	0.956	0.911
S8	0.999	0.999	0.997	0.996	0.997	0.899	0.902	1.000	1.000	0.998	0.999	0.999	0.996	0.978	0.992	0.992	0.907	0.998
S9	0.999	0.999	0.997	0.997	0.998	0.897	0.911	1.000	1.000	0.999	0.999	0.999	0.997	0.98	0.993	0.993	0.902	0.999
S10	0.985	0.991	0.997	0.997	0.998	0.903	0.908	0.998	0.999	1.000	1.000	1.000	0.998	0.98	0.996	0.996	0.893	0.999
S11	0.972	0.969	0.997	0.997	0.998	0.895	0.901	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000	0.998	0.979	0.995	0.995	0.896	0.999
S12	1.000	0.999	0.996	0.996	0.998	0.999	0.871	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000	0.997	0.978	0.994	0.994	0.902	0.999
S13	1.000	1.000	0.999	0.999	1.000	1.000	0.853	0.996	0.997	0.998	0.998	0.997	1.000	0.988	0.999	0.998	0.883	0.999
S14	0.998	0.999	0.987	0.984	0.975	0.999	0.894	0.987	0.980	0.980	0.979	0.978	0.988	1.000	0.987	0.984	0.868	0.985
S15	0.999	0.991	0.997	0.992	0.993	0.999	0.832	0.992	0.993	0.996	0.995	0.994	0.999	0.987	1.000	1.000	0.872	0.997
S16	0.999	0.984	0.991	0.987	0.995	0.897	0.901	0.992	0.993	0.996	0.995	0.994	0.998	0.984	1.000	1.000	0.871	0.997
S17	0.924	0.915	0.896	0.895	0.903	0.978	0.956	0.907	0.902	0.893	0.896	0.902	0.883	0.868	0.872	0.871	1.000	0.903
R	1.000	1.000	0.999	0.999	0.999	0.908	0.911	0.998	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.985	0.997	0.997	0.903	1.000

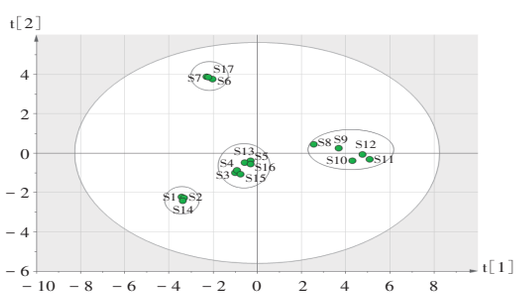


图 3　主成分分析得分图

Fig. 3　Scores plot for the PCA

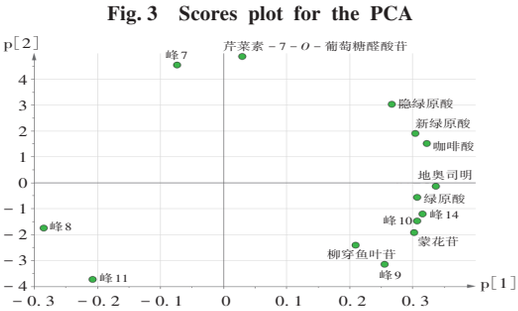


图 4　主成分分析载荷图

Fig. 4　Loading plot for the PCA

合物(图 6),按数值大小排序分别为芹菜素 - 7 - *O* - 葡萄糖醛酸苷 > 峰 7 > 绿原酸 > 峰 9 > 隐绿原酸 > 柳穿鱼叶苷,表明这 6 种成分为引起不同批次样品质量差异的主要成分。

2.4　含量测定

2.4.1　溶液制备

取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、蒙花苷、柳穿鱼叶苷对照品各适量,精密称定,分别加 70% 乙醇制成质量浓度为 1.31, 1.22, 1.05, 2.03, 5.11 mg / mL 的对照品贮备液;再分别精密量取 1 mL,置同一 50 mL 容量瓶中,加 70% 乙醇制成每 1 mL 分别含新绿原酸、绿原酸、隐绿

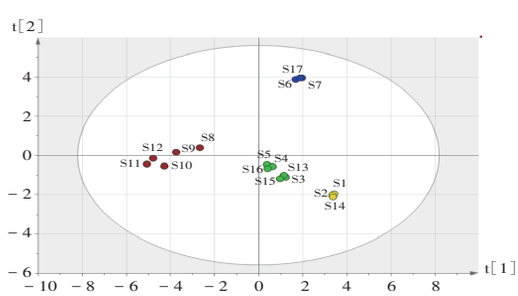


图 5　正交偏最小二乘判别分析得分图

Fig. 5　Scores plot for the OPLS - DA



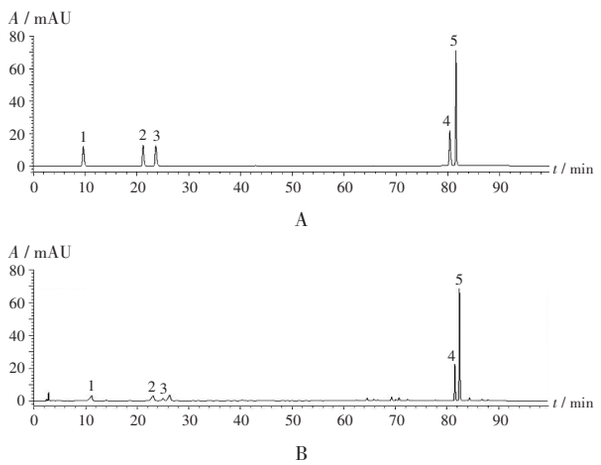
图 6　正交偏最小二乘判别分析 VIP 图

Fig. 6　VIP plot for the OPLS - DA

原酸、蒙花苷、柳穿鱼叶苷 26.14，24.34，21.04，40.67，102.30 μg的混合对照品溶液。

2.4.2 *方法学考察*

专属性试验：精密量取2.4.1项下混合对照品溶液和2.1.2项下供试品溶液各适量，按2.1.1项下色谱条件进样测定。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、蒙花苷、柳穿鱼叶苷5种待测成分的分离度均大于1.5，色谱峰峰形良好，理论板数均大于8 000，供试品溶液在与混合对照品溶液相同保留时间处有相应色谱峰出现，表明方法专属性良好。详见图7。



1. 新绿原酸 2. 绿原酸 3. 隐绿原酸 4. 蒙花苷 5. 柳穿鱼叶苷
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图7 专属性试验高效液相色谱图

1. Neochlorogenic acid 2. Chlorogenic acid 3. Cryptochlorogenic acid 4. Caffeic acid 5. Diosmin
A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 7 HPLC chromatograms of the specificity test

线性关系考察：分别精密量取2.4.1项下新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、蒙花苷、柳穿鱼叶苷对照品贮备液各0.1，0.5，1.0，2.5，5.0 mL，分别置50 mL容量瓶中，加70%乙醇定容，制成系列质量浓度的混合对照品溶液，按2.1.1项下色谱条件进样测定，以质量浓度为横坐标（X，μg/mL）、峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归，得回归方程。结果见表3。

表3 大蓟配方颗粒5种成分线性关系考察结果（n = 5）

Tab. 3 Results of the linear relation test of five components in CJFG（n = 5）

成分	回归方程	线性范围（μg/mL）	r
新绿原酸	$Y = 2.58 \times 10^3 X + 47\,756$	2.62～131.00	0.999 1
绿原酸	$Y = 2.78 \times 10^4 X + 47\,931$	2.44～122.00	0.999 1
隐绿原酸	$Y = 2.61 \times 10^3 X + 41\,305$	2.10～105.00	0.999 5
蒙花苷	$Y = 1.18 \times 10^4 X + 15\,819$	4.06～203.00	0.999 3
柳穿鱼叶苷	$Y = 1.96 \times 10^3 X + 11\,785$	10.22～511.00	0.999 9

精密度试验：精密量取2.4.1项下混合对照品溶液适量，按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、蒙花苷、柳穿鱼叶苷峰面积的*RSD*分别为1.01%，1.18%，0.80%，0.92%，0.60%（n = 6），表明仪器精密度良好。

重复性试验：取样品（编号为S8）适量，精密称定，按2.1.2项下方法平行制备供试品溶液6份，按2.1.1项下色谱条件进样测定，并计算含量。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、蒙花苷、柳穿鱼叶苷含量的*RSD*分别为1.29%，1.50%，1.12%，1.01%，0.92%（n = 6），表明方法重复性良好。

稳定性试验：取样品（编号为S8）适量，精密称定，按2.1.2项下方法制备供试品溶液，按2.1.1项下色谱条件分别于0，2，4，8，12，18，24 h时进样测定，记录峰面积。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、蒙花苷、柳穿鱼叶苷峰面积的*RSD*分别为1.22%，0.92%，1.03%，1.09%，0.90%（n = 7），表明供试品溶液室温下放置24 h稳定性良好。

加样回收试验：取已知成分含量的样品（编号为S8）0.5 g，精密称定，平行9份，按80%，100%，120%的比例加入混合对照品溶液，各3份，按2.1.2项下方法制备供试品溶液，按2.1.1项下色谱条件进样测定，计算回收率。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、蒙花苷、柳穿鱼叶苷的平均加样回收率分别为98.21%，96.40%，95.88%，98.20%，99.12%，*RSD*分别为1.82%，1.40%，2.00%，1.92%，1.51%（n = 9），表明方法准确度良好。

2.4.3 *样品含量测定*

取17批样品（编号为S1－S17）各适量，精密称定，按2.1.2项下方法制备供试品溶液，按2.1.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图，按外标法计算含量。结果见表4。

3 讨论

3.1 提取方法与色谱条件选择

提取方法选择：参考文献[15－19]，分别考察了不同提取溶剂（甲醇－水溶液、乙醇－水溶液），提取方法[超声提取（20，40，60 min）及加热回流提取（30，60，90 min）]的提取效果。结果显示，以70%乙醇为提取溶剂时各色谱峰峰形及响应值均较好，且超声提取40 min时已提取完全，故提取方法选择采用70%乙醇超声40 min。

色谱条件选择：分别以水－0.1%磷酸溶液与甲醇－乙腈混合作为流动相，在190～400 nm全波长进行扫描，发现以乙腈－甲醇（4∶1，V/V）－0.1%磷酸溶液为流动相（梯度洗脱），330 nm波长作为色谱条件最佳，此时色谱峰数目较多，响应值较大，基线较平稳，且各待测成分的色谱峰分离度良好。

3.2 HPLC 指纹图谱与化学模式识别分析

本研究中建立了17批样品的HPLC指纹图谱，确

表4 样品含量测定结果(mg/g)

Fig. 4 Results of content determination of five components in samples (mg / g)

编号	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	蒙花苷	柳穿鱼叶苷
S1	0.19	1.99	1.48	1.74	5.18
S2	0.56	1.76	1.66	2.58	7.64
S3	0.77	1.96	1.37	3.47	12.08
S4	0.68	1.75	1.40	3.27	12.11
S5	0.97	1.21	1.64	4.34	16.96
S6	0.57	1.00	2.28	0.77	1.44
S7	0.50	0.97	2.16	0.87	1.55
S8	1.06	1.87	1.70	3.14	6.93
S9	1.18	1.91	1.60	3.11	7.28
S10	1.16	1.43	1.52	3.22	12.59
S11	1.25	0.98	1.58	3.24	12.99
S12	1.18	1.02	1.60	3.21	11.42
S13	0.21	2.09	1.53	1.71	5.18
S14	0.68	1.96	1.61	3.22	12.25
S15	0.20	2.12	1.53	1.70	5.17
S16	1.05	1.31	1.51	4.31	17.84
S17	0.63	1.02	2.46	0.86	1.60

定了14个共有峰,指认出了8个峰,与对照指纹图谱的相似度均大于0.90,表明总体质量较均一,编号为S6-S7,S17的样品与其他14批有一定差异。通过聚类分析、PCA、OPLS-DA将17批样品分为4类,其中,编号为S1-S2,S14的样品聚为一类,编号为S3-S5,S13,S15-S16的样品聚为一类,编号为S8-S12的样品聚为一类,编号为S6-S7,S17的样品聚为一类,并筛选出芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、峰7、绿原酸、峰9、隐绿原酸、柳穿鱼叶苷对不同批次样品质量差异影响较大的6种成分。不同生产企业、不同批次大蓟配方颗粒的质量存在一定差异,可能是由原料药材的差异或加工工艺的不同和质量控制标准的不足造成。

3.3 含量测定结果分析

本研究中对17批样品中的新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、蒙花苷、柳穿鱼叶苷的含量进行了测定,结果分别为0.19~1.25 mg/g、0.97~2.12 mg/g、1.37~2.46 mg/g、0.77~4.34 mg/g、1.44~17.84 mg/g。表明不同批次的样品中5种成分的含量有一定差异,其中柳穿鱼叶苷的含量差异较大,不同生产企业的样品中新绿原酸和蒙花苷的含量差异也较大,可能是由原料药材的差异和不同生产企业的规格不同导致。柳穿鱼叶苷为大蓟中的主要止血活血成分[20],其含量差异较大对于用量和治疗效果影响较大,应规定其在大蓟配方颗粒中的含量范围,并统一规格,严格规范,以保证大蓟配方颗粒质量的均一性和稳定性。

3.4 方法评价

本研究中建立了大蓟配方颗粒的HPLC指纹图谱,确认了14个共有峰中的8个峰,并进行了聚类分析和化学模式识别,将17批样品分成了4类,筛选出了不同批次样品间的差异成分,并对5种成分进行了含量测定。该方法准确性高、重复性好,能有效评价大蓟配方颗粒的质量。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:26.
[2] 万成杰,张春菁,谢宗会,等. 大蓟抗结核杆菌的活性成分及作用机制研究[J]. 中草药,2021,52(21):6561-6567.
[3] 王卫明,刘 亮,彭 慧,等. 大蓟、小蓟功效的考证和现代研究[J]. 中国现代应用药学,2019,36(1):81-84.
[4] 高梦梦,陈桢琳,郝雅坤,等. 大蓟提取物改善高胆固醇血症模型小鼠的代谢组学研究[J]. 中国药房,2023,34(13):1590-1595.
[5] 赵 彧,邱明阳,刘玉婷,等. 大蓟化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药,2017,48(21):4584-4590.
[6] 谢明晏,张 正,黄 瑶,等. 大蓟不同药用部位的HPLC特征图谱与化学模式识别研究[J]. 中国药房,2020,31(7):820-825.
[7] 孟 然,吴 哲,冯 薇,等. 基于HPLC指纹图谱结合化学模式识别及多成分定量的蒲公英质量评价研究[J]. 中草药,2022,53(24):7887-7896.
[8] 叶梦倩,吴孟华,马志国,等. 香薷HPLC指纹图谱及多指标成分定量分析[J]. 药物分析杂志,2023,43(2):236-244.
[9] 易炳学,张崇佩,李志林,等. 不同产地大蓟、小蓟的指纹图谱研究[J]. 中医药导报,2020,26(13):45-53.
[10] 于 洋,李 军,李宝国. 化学计量学在中药质量控制研究中的应用[J]. 中成药,2018,40(5):1139-1142.
[11] 周湘媛,陈万发,丁 青,等. 基于UPLC指纹图谱和多成分定量评价不同产地升麻药材质量[J]. 中草药,2022,53(17):5497-5530.
[12] 黄娜娜,李 俊,普俊学,等. 党参HPLC指纹图谱结合多种化学模式识别研究[J]. 中国现代应用药学,2022,39(16):2103-2111.
[13] 赵李妮,林 波,梁振纲,等. 基于偏最小二乘法-判别分析算法分析五味子不同炮制品高效液相色谱指纹图谱的变化[J]. 中国药业,2023,32(13):72-76.
[14] 杨小催,郭凯欣,李燕芳,等. 基于指纹图谱结合化学计量学评价栽培与野生五指毛桃质量[J]. 中国药业,2023,32(19):63-69.
[15] 郝晶晶,张府君,甄会贤,等. HPLC法同时测定大蓟及其炮制品中7种成分含量[J]. 中药材,2020,42(5):1115-1118.
[16] 陈向东,谢 菲,张光大,等. HPLC法测定大蓟配方颗粒中蒙花苷和柳穿鱼叶苷的含量[J]. 湖南中医杂志,2013,29(6):118-120.