

指纹图谱结合药效成分含量综合评价银丹活血通瘀颗粒质量^Δ

白淑贤^{1*},王单单¹,吴作敏¹,于晓涛¹,董敬远¹,李叶宁^{2#}(1.漯河市中心医院药学部,河南漯河 462300;2.漯河市中心医院重症医学科,河南漯河 462300)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)14-1743-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.14.09



摘要 **目的** 评价银丹活血通瘀颗粒的质量。**方法** 采用高效液相色谱-紫外-蒸发光散射联用技术建立15批银丹活血通瘀颗粒的指纹图谱,利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)进行相似度评价并确定共有峰;通过与对照品指纹图谱和单味饮片图谱比对,指认共有峰。运用网络药理学筛选指认成分的作用靶点和通路,构建“成分-靶点-通路”网络图,预测银丹活血通瘀颗粒的药效成分,并以同样方法测定药效成分的含量。**结果** 15批样品的指纹图谱中共标定40个共有峰,指认出丹酚酸B、黄芪甲苷、三七皂苷R₁、银杏内酯A等17个成分。网络药理学预测出17个成分主要通过作用于97个靶点和137条通路发挥药效作用。15批样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、迷迭香酸、芒柄花苷、紫草酸、丹酚酸B、芒柄花素、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rd、银杏内酯C、银杏内酯A、银杏内酯B、三七皂苷R₁和黄芪甲苷的平均含量分别为0.126 8、0.232 0、0.073 8、0.353 2、3.620 2、0.191 0、0.333 3、0.317 4、0.785 0、0.538 2、0.460 0、2.475 1、0.347 7 mg/g。**结论** 所建银丹活血通瘀颗粒的指纹图谱可反映制剂整体特点,结合网络药理学建立的其药效成分的含量测定方法准确可靠、重复性好,可用于评价银丹活血通瘀颗粒的质量。**关键词** 银丹活血通瘀颗粒;指纹图谱;含量测定;网络药理学;药效成分;质量评价

Comprehensive evaluation of the quality of Yindan huoxue tongyu granules based on fingerprint combined with content of pharmacodynamic components

BAI Shuxian¹, WANG Dandan¹, WU Zuomin¹, YU Xiaotao¹, DONG Jingyuan¹, LI Yening²(1. Dept. of Pharmacy, Luohe Central Hospital, Henan Luohe 462300, China; 2. Dept. of Critical Care Medicine, Luohe Central Hospital, Henan Luohe 462300, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To evaluate the quality of Yindan huoxue tongyu granules. **METHODS** Taking high performance liquid chromatography with ultraviolet and evaporative light scattering detection as method, the fingerprint of 15 batches of Yindan huoxue tongyu granules was established, and similarity evaluation was performed by *Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of TCM (2012 edition)* to determine common peaks. The common peaks were identified by comparing with reference substance chromatograms and single decoction piece chromatograms. Network pharmacology was used to screen out core targets and pathways of identified components, construct a “component-target-pathway” network diagram, and predict the pharmacodynamic components of Yindan huoxue tongyu granules, and the content determination of these components was carried out by the same method. **RESULTS** HPLC fingerprints of 15 batches of Yindan huoxue tongyu granules were characterized with 40 common peaks, and 17 components including salvianolic acid B, astragaloside IV, notoginsenoside R₁, and ginkgolide A were identified. Network pharmacology predicted that 17 components mainly acted on 97 core targets and 137 pathways to exert their pharmacological effect. Average contents of 13 bioactive components in 15 batches of samples were 0.126 8, 0.232 0, 0.073 8, 0.353 2, 3.620 2, 0.191 0, 0.333 3, 0.317 4, 0.785 0, 0.538 2, 0.460 0, 2.475 1 and 0.347 7 mg/g, including calycosin-7-O-β-D-glucoside, rosmarinic acid, formononetin, lithospermic acid, salvianolic acid B, ononin, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rd, ginkgolide C, ginkgolide A, ginkgolide B, notoginsenoside R₁, and astragaloside IV. **CONCLUSIONS** The established fingerprint of Yindan huoxue tongyu granules can reflect the overall characteristics of the preparation. The content determination method for its pharmacodynamic components, developed in combination with network pharmacology, is accurate, reliable, and exhibits good repeatability, making it suitable for evaluating the quality of Yindan huoxue tongyu granules. **KEYWORDS** Yindan huoxue tongyu granules; fingerprint; content determination; network pharmacology; pharmacodynamic components; quality evaluation

Δ基金项目 河南省科技攻关项目(No.242102310544);河南省中医药科学研究专项课题(No.2023ZY3032);漯河市重大科技创新专项(揭榜挂帅)项目(No.漯科[2022]45号)

*第一作者 主管药师,硕士。研究方向:中药制剂研发、中药药理学。E-mail:1347775482@qq.com

#通信作者 主任医师。研究方向:中药新产品开发与应用。E-mail:49662930@qq.com

银丹活血通瘀方是由黄芪、丹参、三七、银杏叶4味中药组成的临床经验方,具有活血化瘀、补气行血之功效,临床主要用于缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)的治疗,疗效显著。为扩大临床使用范围,提高患者依从性,本课题组拟将该方通过现代化工艺开发为颗粒剂。鉴于制剂质量能直接影响临床疗效与用药安全,因此需

建立完善的质量标准体系,通过多维度综合评价确保中药制剂质量。

中药指纹图谱在中药整体质量控制中应用广泛,是全面评价中药及其制剂质量的有效方法^[1]。网络药理学能多维度阐释中药“化合物-靶点-通路”的相互作用关系,预测其有效化学成分及其作用机制^[2]。本研究采用高效液相色谱-紫外-蒸发光散射联用技术(high performance liquid chromatography with ultraviolet and evaporative light scattering detection, HPLC-UV-ELSD)建立银丹活血通瘀颗粒的指纹图谱,对其共有峰进行指认;采用网络药理学探索银丹活血通瘀颗粒抗IS的药效成分,并在此基础上建立药效成分的定量分析方法,旨在为银丹活血通瘀颗粒的质量评价提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Agilent 1260 型 HPLC 仪购自美国 Agilent 公司;Eppendorf 5810R 型低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司;AUW120D 型十万分之一电子天平购自日本 Shimadzu 公司;Milli-Q 型超纯水仪购自美国 Millipore 公司;KQ5200E 型超声仪购自昆山市超声仪器有限公司。

1.2 主要药品与试剂

芒柄花素、紫草酸对照品(批号分别为 MUST-19033005、MUST-21102314,纯度均不低于 97.71%)均购自成都曼思特生物科技有限公司;咖啡酸、芦丁、芒柄花苷、迷迭香酸、丹酚酸 B、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、人参皂苷 R_{b1}、人参皂苷 R_d、银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_e、黄芪甲苷对照品(批号分别为 DST191030-013、DST200902-017、DSTDC-004401、DST191027-027、DSTDD00903、DST200619-013、DST191212-006、DST190702-015、DST210601-095、DSTDY009601、DSTDY009701、DSTDS005001、DST200722-009、DSTD001401、DSTDH001501,纯度均不低于 98.00%)均购自成都德思特生物技术有限公司;水为自制超纯水。

丹参、黄芪和三七饮片均由漯河市中心医院中药房提供,银杏叶提取物购自中国食品药品检定研究院,经漯河市中心医院主任中药师于晓涛鉴定,分别为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根、豆科植物荚膜黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根、五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶经加工制成的提取物。15 批银丹活血通瘀颗粒(批号分别为 20240722、20240729、20240805、20240812、20240819、20240826、20240902、20240909、20240918、20240923、20240930、20241009、20241014、20241021、20241028,编号 S1~S15)均由漯河市中心医院制剂室自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 HPLC-UV 条件

以 Shim-pack GIST C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为色谱柱;以乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~30 min, 12%A→15%A; 30~35 min, 15%A→17%A; 35~95 min, 17%A→25%A; 95~105 min, 25%A→29%A; 105~120 min, 29%A→32%A; 120~130 min, 32%A→40%A; 130~135 min, 40%A→45%A; 135~140 min, 45%A→50%A; 140~160 min, 50%A→12%A);流速为 1.0 mL/min;柱温为 35 °C;检测波长为 245 nm(0~100 min)和 203 nm(100~160 min);进样量为 10 μL。

2.1.2 HPLC-ELSD 条件

以 Agilent 5 TC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 为色谱柱;以甲醇(A)-水(B)为流动相进行梯度洗脱(0~10 min, 25%A→33%A; 10~20 min, 33%A→42%A; 20~40 min, 42%A→50%A; 40~50 min, 50%A; 50~58 min, 50%A→60%A; 58~77 min, 60%A→80%A; 77~85 min, 80%A);流速为 1.0 mL/min;柱温为 30 °C;ELSD 检测器漂移管温度为 70 °C;雾化器为氮气;体积流量为 1.5 L/min;进样量为 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液

(1)HPLC-UV 供试品溶液:精密称取银丹活血通瘀颗粒细粉(过五号筛)1.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 5 mL,称定质量,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)处理 45 min,放至室温,用 50% 甲醇补足减失质量,以 12 000 r/min 离心 10 min(离心半径为 18.7 cm,下同),取上清液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液,即得。

(2)HPLC-ELSD 供试品溶液:精密称取银丹活血通瘀颗粒细粉(过五号筛)1.5 g,置于圆底烧瓶中,精密加入含 4% 浓氨试液的 80% 甲醇(取浓氨试液 4 mL,加 80% 甲醇至 100 mL,摇匀即得)50 mL,密塞,称定质量,加热回流 1 h,放至室温,再次称定质量,用含 4% 浓氨试液的 80% 甲醇溶液补足减失质量;滤过,滤液蒸干,残渣用 80% 甲醇复溶,转移至 5 mL 容量瓶中,并用 80% 甲醇定容,摇匀,以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取滤液,即得。

2.2.2 混合对照品溶液

取咖啡酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦丁、迷迭香酸、芒柄花苷、紫草酸、丹酚酸 B、芒柄花素、人参皂苷 R_{b1}、人参皂苷 R_d 对照品适量,精密称定,加甲醇制成上述各成分质量浓度分别为 21.5、20.0、1.8、20.0、8.4、18.2、210.0、13.6、21.0、18.5 μg/mL 的混合对照品溶液 1;取银杏内酯 C、银杏内酯 A、银杏内酯 B、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_e、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、黄芪甲苷、人参皂苷 R_d 对照品适量,精密称定,加甲醇制成上述各成分质量浓度分别为 161.5、153.8、196.1、369.2、82.0、68.4、94.2、138.4、140.0 μg/mL 的混合对照品溶液 2。

2.2.3 各单味饮片及提取物供试品溶液

取丹参饮片细粉和黄芪饮片细粉各1 g,三七饮片细粉和银杏叶提取物各0.05 g,分别按“2.2.1”项下方法制备,得各单味饮片及提取物的HPLC-UV供试品溶液和HPLC-ELSD供试品溶液。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验

取“2.2.1”项下2种供试品溶液(编号S10),按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,分别以丹酚酸B(HPLC-UV)和三七皂苷 R_1 (HPLC-ELSD)为参照峰,得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.33%($n=6$),相对峰面积的RSD均小于2.84%($n=6$),表明方法精密度良好。

2.3.2 重复性试验

取“2.2.1”项下2种供试品溶液(编号S10),各6份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别以丹酚酸B(HPLC-UV)和三七皂苷 R_1 (HPLC-ELSD)为参照峰,得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.45%($n=6$),相对峰面积的RSD均小于2.66%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性考察

取“2.2.1”项下2种供试品溶液(编号S10),分别在室温下放置0、3、6、9、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别以丹酚酸B(HPLC-UV)和三七皂苷 R_1 (HPLC-ELSD)为参照峰,得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.59%($n=6$),相对峰面积的RSD均小于2.42%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.4 指纹图谱建立与相似度评价

取15批样品,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样并记录色谱图。将15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S10为参照图谱,设定时间窗宽度为0.1 min,经多点校正后进行Mark峰匹配,得到15批样品的叠加指纹图谱;采用中位数法生成对照指纹图谱R。结果(图1)显示,15批样品共标定40个共有峰,其中HPLC-UV指纹图谱中标定21个,HPLC-ELSD指纹图谱中标定19个。与对照指纹图谱R对比,HPLC-UV指纹图谱中15批样品的相似度为0.988~1.000,HPLC-ELSD指纹图谱中15批样品的相似度为0.956~0.999,提示15批样品的制备工艺稳定,主要化学成分相似。

2.3.5 指纹图谱共有峰指认

取“2.2”项下2种供试品溶液(编号S10)、混合对照品溶液1、混合对照品溶液2、各单味饮片及提取物的2种供试品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。通过与混合对照品图谱和单味饮片图谱对比,从HPLC-UV色谱图(图2A)中指认了10个共有峰,分别为峰3(咖啡酸)、峰5(毛蕊异黄酮葡萄糖苷)、峰6(芦丁)、峰9(迷迭香酸)、峰11(芒柄花苷)、峰12(紫草酸)、峰14(丹酚酸B)、峰19(芒柄花素)、峰20(人参皂苷

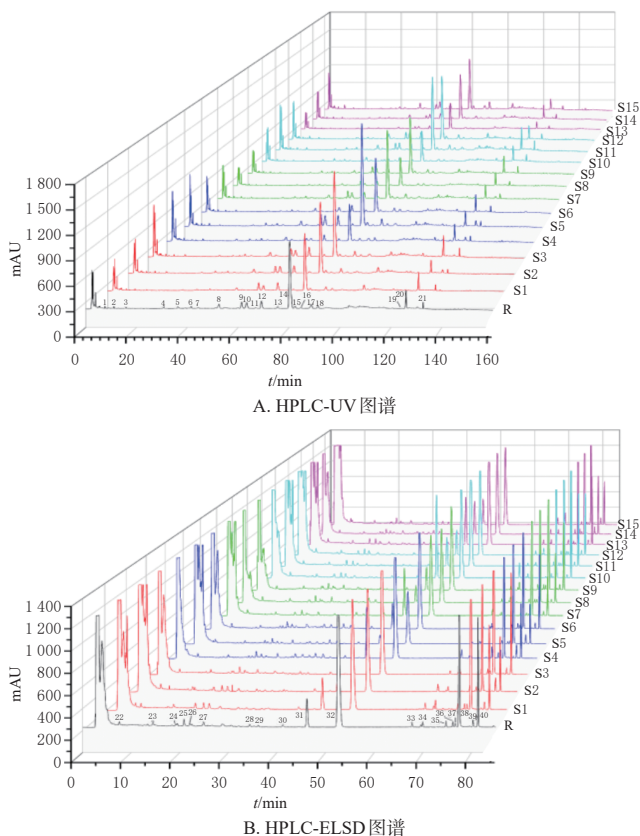


图1 15批银丹活血通瘀颗粒的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱R

R_{b1} 、峰21(人参皂苷 R_d);从HPLC-ELSD色谱图(图2B)中指认了8个共有峰,分别为峰23(银杏内酯C)、峰25(银杏内酯A)、峰26(银杏内酯B)、峰31(三七皂苷 R_1)、峰32(人参皂苷 R_g /人参皂苷 R_e ,峰重叠且多次调整洗脱比例也未能将其分离)、峰38(人参皂苷 R_{b1})、峰39(黄芪甲苷)、峰40(人参皂苷 R_d)。

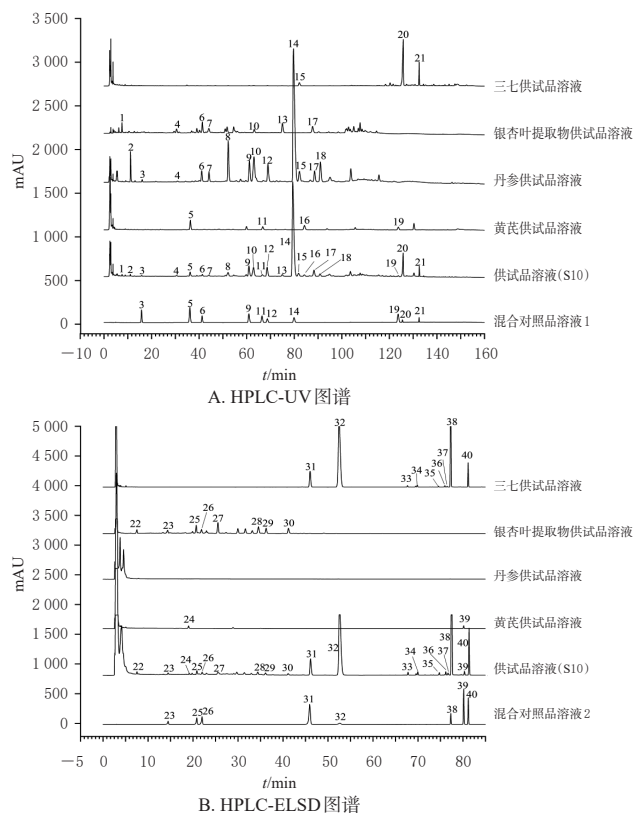
2.4 网络药理学筛选药效成分

2.4.1 作用靶点预测

将指纹图谱指认的17个化合物作为候选化合物,从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获取候选化合物的线性表达式,分别导入Swiss Target Prediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch>)和SuperPRED数据库(<https://prediction.charite.de/index.php>)预测候选化合物的作用靶点,将预测的全部靶点导入UniProt数据库(<http://www.uniprot.org/>)进行归一化处理,去重后共获得385个作用靶点。

2.4.2 疾病靶点预测及化合物-疾病交集靶点的获取

以“ischemic stroke”为关键词,在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、TTD数据库(<https://db.idrblab.net>)及OMMI数据库(<https://omim.org>)中检索并筛选IS疾病靶点,其中GeneCards数据库纳入连接度 ≥ 5.1 (2倍中位数)的靶点;合并上述全部靶点,去重后共获得1 857个疾病靶点。将“2.4.1”项下的385个作用靶点与1 857个疾病靶点进行映射,共获得化合物-疾病交集靶点148个。



3: 咖啡酸; 5: 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 6: 芦丁; 9: 迷迭香酸; 11: 芒柄花苷; 12: 紫草酸; 14: 丹酚酸B; 19: 芒柄花素; 20: 人参皂苷Rb; 21: 人参皂苷Rd; 23: 银杏内酯C; 25: 银杏内酯A; 26: 银杏内酯B; 31: 三七皂苷R₁; 32: 人参皂苷Rg₁/人参皂苷Re; 38: 人参皂苷Rb₁; 39: 黄芪甲苷; 40: 人参皂苷Rd。

图2 各单味饮片及提取物溶液、混合对照品溶液及供试品溶液的HPLC图

2.4.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建及核心靶点筛选

将“2.4.2”项下的148个化合物-疾病交集靶点导入STRING数据库(<https://string-db.org/cgi/input.pl>), 物种设置为“homo sapiens”, 最小相互作用阈值设置为最高置信度(0.9), 隐藏与无关联性的靶点, 得到蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络图。将PPI网络图导入Cytoscape 3.7.2软件进行可视化分析, 移除与主要网络离散的节点后, 共获得97个潜在靶点、274条边的PPI网络图(图3)。利用Cytoscape 3.7.2软件中“Network Analyzer”功能对网络进行拓扑属性分析, 以连接度 ≥ 2 倍中位数, 介数中心性和接近中心性均大于中位数为筛选条件, 共得到26个核心靶点, 其中连接度排前10位的核心靶点分别为SRC、AKT1、STAT3、JUN、MAPK1、MAPK3、PI3KCA、ESR1、PI3KCB、EGFR。

2.4.4 基因本体、京都基因与基因组百科全书富集分析

将“2.4.3”项下的97个潜在靶点导入DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行基因本体(gene ontology, GO)功能和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析, $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

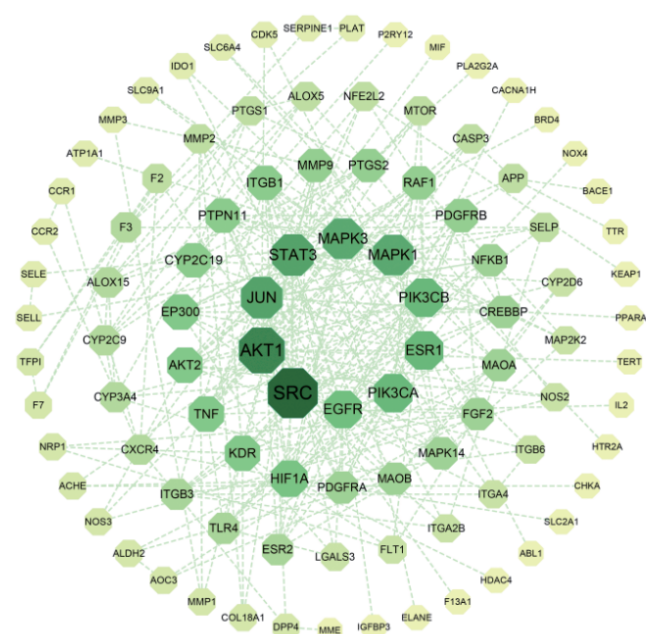


图3 PPI网络图

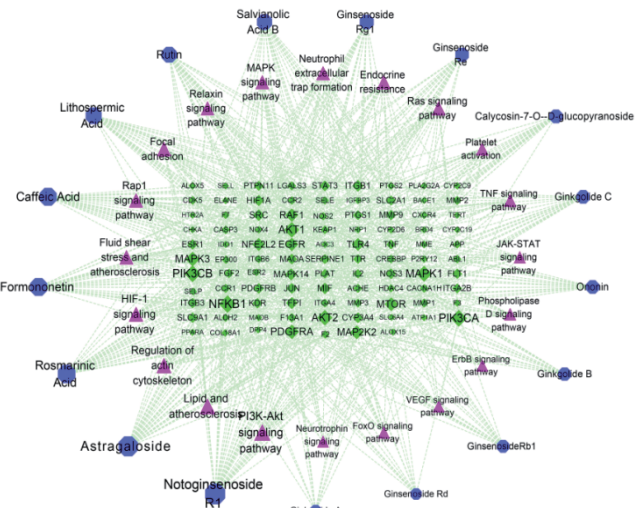
GO富集分析共得到399个条目, 其中生物学过程(biological process, BP)占250个条目, 细胞组分(cellular component, CC)占41个条目, 分子功能(molecular function, MF)占108个条目。BP主要包括胞外信号调节激酶1(extracellular signal-regulated kinase 1, ERK1)和ERK2级联的正调控、炎症反应和磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号转导的正调控等; CC主要包括质膜、细胞表面和黏着斑等; MF主要包括酶结合、相同蛋白质结合和整合素结合等过程。

KEGG富集分析共得到137条主要通路, 排除肿瘤、乙型肝炎等与疾病不相关的通路后, 主要涉及PI3K/Akt信号通路、脂质与动脉粥样硬化、低氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)信号通路、促分裂原活化的蛋白质激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路等。

2.4.5 药效成分、靶点和通路筛选

为进一步确定银丹活血通瘀颗粒的药效成分, 为后续成分含量测定做铺垫, 将指认出的17个化合物、97个潜在靶点和P值排前20位的主要通路运用Cytoscape 3.7.2软件构建“成分-靶点-通路”网络图(图4)。以介数中心性、接近中心性及连接度均大于中位数为筛选条件, 得到17个化合物可能是银丹活血通瘀颗粒治疗IS的药效成分, 且连接度越高, 说明化合物对应的药效越强; 97个潜在靶点中, 有22个靶点满足筛选条件, 与26个核心靶点取交集, 共得到NF κ B1、PI3KCA、PI3KCB、MAPK1、AKT1、AKT2、PDGFRA、MAPK3、EGFR、RAF1、ITGB1、HIF1A、STAT3 13个靶点, 可能是银丹活血通瘀颗粒发挥治疗IS作用的关键靶点; 20条核心通路中, 除红细胞癌基因B(ErbB)信号通路外, 其余通路连接都区

别不大,均可能是关键信号通路。由此提示,银丹活血通瘀颗粒中药效成分可通过作用于多个靶点、干预多条信号通路发挥治疗IS的作用。



紫色六边形:化合物;绿色菱形:潜在靶点;桃红色三角形:信号通路;图形越大,连接度越大。

图4 “成分-靶点-通路”网络图

2.5 银丹活血通瘀颗粒药效成分含量测定

根据网络药理学分析筛选结果,17个指认成分均具有较好的药理活性,可作为评价银丹活血通瘀颗粒质量的潜在指标。由于咖啡酸、芦丁、人参皂苷Re和人参皂苷Rg₁分离度达不到要求,未纳入含量测定,本研究仅对其余13个成分进行含量测定,其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、迷迭香酸、芒柄花苷、紫草酸、丹酚酸B、芒柄花素、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rd采用HPLC-UV法,银杏内酯C、银杏内酯A、银杏内酯B、三七皂苷R₁、黄芪甲苷采用HPLC-ELSD法。

2.5.1 线性关系考察

取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、迷迭香酸、芒柄花苷、紫草酸、丹酚酸B、芒柄花素、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rd对照品适量,精密称定,加甲醇制成上述各成分质量浓度分别为64.0、106.4、42.8、162.0、1 650.0、102.1、168.0、148.0 μg/mL的混合对照品溶液1’;取银杏内酯C、银杏内酯A、银杏内酯B、三七皂苷R₁、黄芪甲苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成上述各成分质量浓度分别为484.6、461.55、313.85、1 772.3、415.4 μg/mL的混合对照品溶液2’。将上述两种混合对照品溶液用甲醇逐级稀释,得到不同系列质量浓度的混合标准溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各对照品质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归。结果见表1。

2.5.2 精密度试验

取“2.2.1”项下2种供试品溶液(编号S10),按“2.1”项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果显示,上述13个成分峰面积的RSD为0.56%~2.36%(n=6),表明方法精密度良好。

表1 毛蕊异黄酮葡萄糖苷等13个成分的线性关系考察结果

成分	回归方程	R ²	线性范围/(μg/mL)
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	y=23.776x+60.042	0.999 2	6.40~64.00
迷迭香酸	y=56.194x+94.505	0.999 0	10.64~106.40
芒柄花苷	y=32.993x-6.508 5	0.999 5	4.28~42.80
紫草酸	y=45.38x+143.96	0.999 3	16.20~162.00
丹酚酸B	y=36.569x+11 041	0.999 6	165.00~1 650.00
芒柄花素	y=5.811 7x-3.72	0.999 1	10.21~102.10
人参皂苷Rb ₁	y=68.517x+0.420 7	0.999 5	16.80~168.00
人参皂苷Rd	y=15.762x-6.253 7	0.999 8	14.80~148.00
银杏内酯C	y=2.931 6x-99.788	0.999 1	96.92~484.60
银杏内酯A	y=6.408 3x-238.24	0.999 2	92.31~461.55
银杏内酯B	y=6.319 1x-263.32	0.999 5	62.77~313.85
三七皂苷R ₁	y=12.862x-1 643.7	0.999 0	177.23~1 772.30
黄芪甲苷	y=24.281x-1 760.2	0.999 4	83.08~415.40

2.5.3 重复性试验

取同一批银丹活血通瘀颗粒(编号S10),共6份,按“2.2.1”项下方法制备2种供试品溶液,按“2.1”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,上述13个成分含量的RSD为0.76%~2.51%(n=6),表明该方法重复性良好。

2.5.4 稳定性试验

取“2.2.1”项下2种供试品溶液(编号S10),分别在室温下放置0、3、6、9、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,上述13个成分峰面积的RSD为0.57%~2.02%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.5.5 加样回收率试验

取已知成分含量的银丹活血通瘀颗粒,共6份,精密加入一定量的对照品溶液,按“2.2.1”项下方法制备2种供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,上述13个成分的平均加样回收率为97.95%~103.67%,RSD为0.28%~1.39%(n=6)。

2.5.6 样品含量测定

取15批银丹活血通瘀颗粒,按“2.2.1”项下方法制备2种供试品溶液,按“2.1”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。每批样品平行测定3次。结果见表2。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择及样品前处理方法考察

本研究前期,在设置HPLC-UV参数时,分别对不同提取方法(加热回流提取、超声提取)、提取溶剂(甲醇、50%甲醇、水)、流动相(乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸溶液)、柱温(25、30、35 ℃)及检测波长(203、210、245、280 nm)进行了考察,最终确立了本研究所用的HPLC-UV条件。因黄芪甲苷、三七皂苷R₁、银杏内酯类等成分的UV吸收较弱,不适合在UV下测定,故采用ELSD检测器进行检测。在设置HPLC-ELSD参数时,分别对样品处理方法(水饱和正丁醇提取、氨试液的醇溶剂回流提取)、流动相(甲醇-水、乙腈-水)、漂移管温度(50、70、

表2 15批样品的含量测定结果(n=3,mg/g)

编号	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	迷迭香酸	芒柄花苷	紫草酸	丹酚酸B	芒柄花素	人参皂苷Rb ₁	人参皂苷Rd	银杏内酯C	银杏内酯A	银杏内酯B	三七皂苷R ₁	黄芪甲苷
S1	0.061 6	0.274 5	0.052 3	0.363 4	2.760 9	0.102 0	0.316 5	0.283 5	1.079 6	0.529 2	0.622 4	2.007 9	0.342 8
S2	0.156 9	0.253 7	0.083 8	0.356 4	4.112 6	0.176 3	0.242 6	0.198 0	0.762 0	0.482 8	0.574 0	3.239 7	0.434 5
S3	0.059 7	0.306 4	0.076 9	0.484 2	5.591 3	0.312 8	0.431 1	0.444 5	0.791 9	0.579 0	0.378 2	1.761 9	0.334 2
S4	0.117 7	0.085 4	0.046 6	0.287 2	1.358 0	0.424 5	0.371 1	0.272 0	0.621 8	0.530 9	0.423 5	3.176 5	0.442 9
S5	0.246 2	0.493 1	0.137 6	0.578 4	8.202 7	0.290 1	0.321 8	0.293 5	0.586 9	0.463 8	0.317 7	0.891 4	0.383 2
S6	0.092 4	0.177 8	0.055 9	0.352 3	3.130 6	0.117 0	0.373 0	0.326 2	0.6520	0.560 4	0.451 7	1.842 5	0.334 5
S7	0.134 1	0.307 8	0.067 7	0.335 6	4.680 0	0.283 3	0.296 3	0.276 9	0.768 8	0.510 8	0.302 2	3.119 9	0.316 1
S8	0.074 8	0.174 3	0.045 0	0.237 9	0.888 8	0.082 1	0.262 8	0.238 8	0.771 4	0.658 9	0.393 5	1.405 7	0.296 0
S9	0.191 3	0.273 6	0.086 3	0.349 8	3.698 5	0.237 5	0.385 1	0.399 3	0.684 3	0.570 0	0.375 5	1.754 9	0.331 1
S10	0.236 2	0.059 3	0.097 5	0.200 7	1.209 8	0.205 8	0.330 8	0.400 5	0.734 3	0.502 6	0.579 1	5.601 6	0.300 8
S11	0.131 4	0.297 3	0.097 5	0.451 3	5.986 4	0.186 4	0.561 6	0.570 6	1.126 7	0.473 2	0.496 4	2.176 8	0.306 1
S12	0.085 6	0.315 9	0.071 7	0.425 7	5.080 3	0.067 1	0.319 3	0.321 3	1.160 7	0.551 4	0.606 7	2.003 6	0.321 5
S13	0.097 1	0.090 2	0.054 4	0.175 8	0.837 6	0.093 9	0.159 0	0.180 1	0.717 2	0.529 8	0.539 4	3.437 4	0.322 0
S14	0.144 1	0.143 3	0.058 2	0.318 7	2.986 2	0.192 3	0.347 5	0.316 4	0.554 3	0.489 8	0.402 4	2.584 2	0.381 2
S15	0.072 6	0.226 7	0.075 8	0.381 3	3.779 8	0.093 4	0.281 1	0.239 1	0.762 8	0.639 7	0.437 6	2.121 9	0.367 9
平均值	0.126 8	0.232 0	0.073 8	0.353 2	3.620 2	0.191 0	0.333 3	0.317 4	0.785 0	0.538 2	0.460 0	2.475 1	0.347 7

90℃)、氮气流速(1.5、2.0 L/min)进行了考察,最终确定了本研究所用的HPLC-ELSD条件。

3.2 药效成分筛选

根据网络药理学预测结果,17个指认成分均可能是发挥药理活性的药效成分。黄芪为银丹活血通瘀颗粒君药,具有补气升阳之功效,使气旺血行以治本。毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、芒柄花素等是黄芪黄酮类的主要成分,研究发现,黄芪黄酮类成分能降低脑梗死模型的神经功能评分和脑梗死面积,促进神经干细胞增殖并诱导分化为神经元和少突胶质细胞^[3]。黄芪中的皂苷类成分黄芪甲苷在脑损伤过程中具有抑制氧化应激及细胞凋亡、减轻炎症反应、保护血脑屏障、修复神经功能损伤和促进神经干细胞增殖等多重作用^[4]。佐药三七、银杏叶、丹参活血化瘀,可散通络以治标。有文献报道,银杏内酯类成分是银杏叶特有的活性成分,主要包括二萜类(如银杏内酯A、B、C)和倍半萜类(白果内酯),该类成分具有减轻脑水肿、改善能量代谢、促进神经功能修复和重构等多种神经保护作用,对IS有良好的治疗效果^[5-6]。丹参的水溶性成分具有防止脑缺血损伤、抗血小板聚集、抗氧化、改善记忆功能紊乱等多重药理作用^[7],多年来一直用于治疗心血管疾病。三七皂苷类成分是三七中的主要生物活性成分,研究表明,三七皂苷类成分具有保护神经细胞、抑制氧化应激、抑制炎症反应、降低兴奋性神经毒性和保护神经血管单元等多种生物活性,对IS、帕金森病、阿尔茨海默病等中枢神经系统疾病有良好的治疗作用^[8]。因此,17个指认成分均可作为银丹活血通瘀颗粒含量测定的指标成分。

3.3 银丹活血通瘀颗粒的质量综合评价

15批样品共标定了40个共有峰,指认出17个成分,相似度均不小于0.956,表明银丹活血通瘀颗粒生产工艺稳定,整体质量均一性好。含量测定结果显示,15批样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、迷迭香酸、芒柄花苷、紫草酸、丹酚酸B、芒柄花素、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Rd、银杏内酯C、银杏内酯A、银杏内酯B、三七皂苷R₁、黄芪甲苷含量存在一定差异,这可能与不同批次药材的质量差

异有关。故为保证成品质量稳定,应严格把控药材的来源、质量;另外在生产过程中,可对上述13个成分进行动态检测分析,以确保银丹活血通瘀颗粒的质量稳定,保证临床用药的安全性和有效性。

综上所述,本研究建立的银丹活血通瘀颗粒指纹图谱可反映制剂整体特点,结合网络药理学建立的其药效成分的含量测定方法准确可靠、重复性好,可用于评价银丹活血通瘀颗粒的质量。

参考文献

[1] 陈松,李运容,农璐蔚,等. 基于HPLC指纹图谱和多成分含量综合评价扶正胶囊的质量[J]. 中国药房,2024,35(22):2726-2731.

[2] 陈伟燕,耿晓梅,卜明楠,等. 基于UPLC指纹图谱结合网络药理学及含量测定的经典方名酸枣仁汤质量评价[J]. 中国医院药学杂志,2025,45(2):141-147.

[3] GAO H, HUANG N J, WANG W W, et al. Astragalus flavone induces proliferation and differentiation of neural stem cells in a cerebral infarction model[J]. Med Sci Monit,2022,28:e933830.

[4] 左春月,李猛,靳晓飞,等. 黄芪甲苷干预的神经干细胞外泌体通过抑制经典细胞焦亡途径减轻缺血性脑卒中大鼠脑损伤[J]. 中国病理生理杂志,2025,41(2):277-286.

[5] 周黎,项予良,郭昭婷,等. 银杏内酯注射液对比丁苯酞注射液治疗大动脉粥样硬化性缺血性脑卒中的最小成本分析[J]. 中国药房,2020,31(18):2235-2239.

[6] 王刚,姚明江,徐立,等. 银杏内酯类成分治疗缺血性脑卒中药理作用机制的研究进展[J]. 中药药理与临床,2021,37(2):216-220.

[7] LIU C D, DU L D, ZHANG S, et al. Network pharmacology and experimental study of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* bunge in preventing ischemic stroke[J]. Front Pharmacol,2023,14:1108518.

[8] 袁茵,张妍妍,鞠爱霞,等. 三七皂苷类成分的神经保护机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(13):184-190.

(收稿日期:2025-04-16 修回日期:2025-06-24)
(编辑:邹丽娟)