

六经头痛片 HPLC 指纹图谱建立及多指标成分定量测定研究

王月红¹, 游飞祥^{2#}, 王磊³, 许浚^{2,4}, 袁雪海³, 龚苏晓⁴, 朱晓丹³, 韩彦琪⁴, 张洪兵⁴, 张铁军^{4*}, 陈常青^{4*}

1. 天津医科大学, 天津 300070
2. 天津中医药大学, 天津 300193
3. 天津中新药业集团股份有限公司隆顺榕制药厂, 天津 300457
4. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 建立六经头痛片(LTT) HPLC 指纹图谱, 并采用波长切换技术同时定量测定 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、特女贞苷和大豆苷元, 为评价 LTT 质量提供依据。方法 采用 HPLC 法, 以 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 乙腈-0.1%磷酸水为流动相, 分别建立 LTT 高极性和低极性部分指纹图谱, 并采用波长切换技术同时测定 LTT 中 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、特女贞苷和大豆苷元 5 种指标性成分量。结果 分别建立了 11 批 LTT 高、低极性部分指纹图谱, 其相似度均大于 0.90; 低极性指纹谱确定了 16 个共有峰, 对其中 12 个共有峰进行了归属, 11、12、13 号峰来源于白芷, 1、2、3、7 号峰来源于葛根, 8 号峰来源于女贞子, 5、6 号峰来源于川芎, 15 号峰来源于藁本, 4 号峰为川芎和藁本的共有峰, 对其中 7 个共有峰经对照品指认, 分别为葛根素(1 号峰)、3'-甲氧基葛根素(2 号峰)、大豆苷(3 号峰)、阿魏酸(4 号峰)、大豆苷元(7 号峰)、欧前胡素(11 号峰)和异欧前胡素(13 号峰); 高极性指纹图谱确定了 10 个共有峰, 其中 2~9 号峰来源于葛根, 1、10 号峰来源于女贞子, 对其中 5 个共有峰经对照品指认, 分别为 3'-羟基葛根素(2 号峰)、葛根素(3 号峰)、3'-甲氧基葛根素(4 号峰)、大豆苷(7 号峰)和特女贞苷(10 号峰)。多成分定量测定中, 3'-羟基葛根素在 71.60~716.00 ng ($r=0.9991$)、葛根素在 407.78~4077.80 ng ($r=0.9994$)、大豆苷在 90.72~907.20 ng ($r=0.9999$)、特女贞苷在 95.80~958.00 ng ($r=0.9991$)、大豆苷元在 21.98~219.80 ng ($r=0.9999$) 线性关系良好, 平均加样回收率和相应的 RSD 分别为 101.1%、1.38%, 97.8%、0.72%, 99.1%、0.75%, 97.8%、2.75%, 98.7%、0.70%; 10 批样品中 3'-羟基葛根素量为 3.08~3.84 mg/mL、葛根素 17.71~21.24 mg/mL、大豆苷 3.51~4.71 mg/mL、特女贞苷 1.40~5.69 mg/mL、大豆苷元 0.66~0.86 mg/mL。结论 该法稳定可靠、重复性好, 通过 HPLC 指纹图谱结合多指标定量测定方法较全面地反映了 LTT 内在质量, 为其质量控制提供了可靠的科学依据。

关键词: 六经头痛片; HPLC; 指纹图谱; 3'-羟基葛根素; 葛根素; 大豆苷; 特女贞苷; 大豆苷元; 白芷; 葛根; 女贞子; 川芎; 藁本

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)20-4167-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.006

Fingerprint and multi-components content simultaneous determination for Liujiang Toutong Tablets by HPLC

WANG Yue-hong¹, YOU Fei-xiang², WANG Lei³, XU Jun^{2,4}, YUAN Xue-hai³, GONG Su-xiao⁴, ZHU Xiao-dan³, HAN Yan-qi⁴, ZHANG Hong-bing⁴, ZHANG Tie-jun⁴, CHEN Chang-qing⁴

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
3. Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co., Ltd., Longshunrong Pharmaceutical Factory, Tianjin 300457, China
4. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

收稿日期: 2017-05-14

作者简介: 王月红, 女, 硕士研究生, 主要从事中药复方制剂研究。Tel: (022)23006843 E-mail: wangyuehong1208@163.com

*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjipr.com

陈常青 E-mail: chencq@tjipr.com

#并列第一作者 游飞祥, 男, 硕士研究生, 主要从事中药复方分析研究。Tel: (022)23006843

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Liuqing Toutong Tablets (LTT) and multi-wavelength method for determination of the contents of 3'-hydroxy puerarin, puerarin, daidzin, nuezhenide, and daidzein, so as to provide a reference for the quality control. **Methods** Using the method of HPLC, the fingerprint chromatography of high polarity and low polarity were established, with a mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid and Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). Furtherly, the Diamonsil C₁₈ column was used with a mobile phase of acetonitrile-0.1% acetic acid gradient elution to determine the five contents. **Results** The fingerprint chromatography of high and low polarities with 11 batches of LTT were established, and the similarities of 11 batches were all over 0.90. The low polarity fingerprint chromatography included 16 mutual peaks, 12 of which belonged to herbs: No. 11, 12, 13 belonged to *Angelicae Dahuricae Radix*, No. 1, 2, 3, 7 belonged to *Puerariae Lobatae Radix*, No. 8 belonged to *Ligustri Lucidi Fructus*, No. 5, 6 belonged to *Chuanxiong Rhizoma*, No. 15 belonged to *Ligustici Rhizoma et Radix* and No. 4 belonged to *Chuanxiong Rhizoma* and *Ligustici Rhizoma et Radix*. Seven peaks including puerarin (No. 1), 3'-methoxy puerarin (No. 2), daidzin (No. 3), ferulic acid (No. 4), daidzein (No. 7), imperatorin (No. 11), and isoimperatorin (No. 13) were verified by standard compounds. The high polarity fingerprint chromatography included 10 mutual peaks, among them No. 2—9 belonged to *Puerariae Lobatae Radix*, No. 1, 10 belonged to *Ligustri Lucidi Fructus*. Five peaks including 3'-hydroxypuerarin (No. 2), puerarin (No. 3), 3'-methoxypuerarin (No. 4), daidzin (No. 7) and specnuezhenide (No. 10) were verified by standard compounds. The five active components were well separated and showed good linearity, such as 3'-hydroxy puerarin 71.60—716.00 ng ($r = 0.999 1$), puerarin 407.78—4 077.80 ng ($r = 0.999 4$), daidzin 90.72—907.20 ng ($r = 0.999 9$), nuezhenide 95.80—958.00 ng ($r = 0.999 1$), daidzein 21.98—219.80 ng ($r = 0.999 9$). The average recoveries and corresponding RSD values were 101.1% (1.38%), 97.8% (0.72%), 99.1% (0.75%), 97.8% (2.75%), and 98.7% (0.70%). The contents of 3'-hydroxypuerarin, puerarin, daidzin, specnuezhenide and daidzein in the 10 batches of sample were 3.08—3.84 mg/mL, 17.71—21.24 mg/mL, 3.51—4.71 mg/mL, 1.40—5.69 mg/mL, and 0.66—0.86 mg/mL, respectively. **Conclusion** The HPLC fingerprint combined with multi index determination method can reflect the intrinsic quality of LTT, which is stability, accurate, and reproducible, providing a scientific reference for quality control.

Key words: Liuqing Toutong Tablets; HPLC; fingerprint; 3'-hydroxy puerarin; puerarin; daidzin; nuezhenide; daidzein; *Angelicae Dahuricae Radix*; *Puerariae Lobatae Radix*; *Ligustri Lucidi Fructus*; *Chuanxiong Rhizoma*; *Ligustici Rhizoma et Radix*

六经头痛片 (Liuqing Toutong Tablet, LTT) 为国家二级中药保护品种, 收载于《卫生部药品标准》, 由白芷、辛夷、藁本、川芎、葛根、细辛、女贞子、菟蔚子、荆芥穗油 9 味药组成, 具有疏风活络、止痛利窍的功效, 主治全头痛、偏头痛及局部头痛, 该药经多年临床实践与应用, 疗效确切^[1]。但现行质量标准仅有常规检查项内容, 文献中关于 LTT 的质量控制研究仅局限于薄层色谱鉴别或单个指标成分的定量测定^[2-5]。而中药复方制剂疗效是多指标、多靶点、多成分共同作用的结果, 只控制一种成分不能完整地体现该品种的内在质量, 无法全面控制药品的质量^[6-9]。本实验采用指纹图谱技术结合多成分定量测定^[9-10], 能够全面地评价 LTT 的内在质量。

本课题组前期已对 LTT 中的化学成分进行了全面的分析, 研究发现^[11]该复方制剂成分复杂, 极性跨度较宽, 目前的分离技术很难将极性差异较大的成分同时分离, 因此有必要按极性分组, 通过不同溶剂提取分离, 再分别建立指纹图谱, 形成一组图谱来综合反映中药复方制剂质量^[12-13]。本实验首次采用极性分段法建立高、低极性成分 2 张指纹图谱及 HPLC 波长切换法同时定量测定 LTT 中质量分数较高且在六经头痛片血中移行成分研究中能够进入

大鼠血浆的 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、特女贞苷和大豆苷元 5 种指标性成分, 从而更全面地反映 LTT 质量, 以期建立科学的 LTT 质量评价体系提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 μm, 5 μm) 色谱柱, 美国 Dikma 公司; Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱, 美国 Agilent 公司; AB204-N 电子天平, 德国梅特勒公司; SHZ-CB 循环水式多用真空泵, 巩义市予华仪器有限责任公司; AS3120 超声仪, 奥特宝恩斯仪器有限公司; 双列四孔电热恒温水浴锅, 山东医疗器械厂; TG20-WS 台式高速离心机, 长沙维尔康湘鹰离心机有限公司。

对照品葛根素 (批号 110752-200511, 质量分数 97.8%)、大豆苷 (批号 11138-201302, 质量分数 91.3%)、特女贞苷 (批号 111926-201404, 质量分数 ≥ 98.0%)、欧前胡素 (批号 110726-201414, 质量分数 99.7%)、异欧前胡素 (批号 110853-201404, 质量分数 99.7%) 均购自中国食品药品检定研究院; 大豆苷元 (批号 MUST-16022713, 质量分数 99.9%) 购自成都曼思特生物科技有限公司; 阿魏酸 (批号

20151215, 质量分数 $\geq 98.0\%$) 购自天津士兰科技有限公司; 3'-羟基葛根素(批号 20160203, 质量分数 $\geq 98.0\%$) 购自天津万象科技有限公司; 3'-甲氧基葛根素(批号 JL20160804001, 质量分数 $\geq 98.0\%$) 购自上海将来试剂有限公司。

LTT 由天津中新药业隆顺裕制药厂提供, 批号分别为 DL12445、EA12448、EA12447、ED12463、EA12450、DE12431、EI12459、EC12452、EC12451、EI12458、DK12444, 分别编号为 S1~S11, 白芷为伞形科当归属植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hofm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根、葛根为豆科葛属植物葛根 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根、女贞子为木犀科女贞属植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实、川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、藁本为伞形科藁本属植物藁本 *Ligusticum sinense* Oliv. 的干燥根茎和根、菘蔚子为唇形科植物益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的干燥成熟果实、辛夷为兰科植物望春花 *Magnolia biondii* Pamp. 的干燥花蕾、细辛为马兜铃科植物华细辛 *Asarum sieboldii* Miq. 的干燥根和根茎, 8 味药材由天津中新药业隆顺裕制药厂提供, 各药材经天津药物研究院张铁军研究员鉴定, 均符合《中国药典》2015 年版规定。乙腈、甲醇, 色谱纯, 天津市康科德科技有限公司; 磷酸、乙酸, 分析纯, 天津市光复科技发展有限公司; 其他液体试剂均为分析纯; 水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 低极性部分 HPLC 指纹图谱色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm \times 4.6 μ m, 5 μ m); 检测波长 260 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 13%~14%乙腈; 5~18 min, 14%~25%乙腈; 18~35 min, 25%~50%乙腈; 35~60 min, 50%~90%乙腈; 60~65 min, 90%~100%乙腈。

2.1.2 高极性部分 HPLC 指纹图谱色谱条件 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 10%~11%乙腈; 5~20 min, 11%乙腈; 20~25 min, 11%~12%乙腈; 25~35 min, 12%~14%乙腈; 35~50 min, 14%~25%乙腈; 50~60 min, 25%乙腈; 其余条件同“2.1.1”项。

2.1.3 多成分定量测定色谱条件 流动相为乙腈-0.1%乙酸水溶液, 梯度洗脱: 0~30 min, 10%~13%

乙腈; 30~55 min, 13%~33%乙腈; 55~60 min, 33%~100%乙腈; 检测波长: 0~40 min, 在 250 nm 波长下检测 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷; 40~48 min, 在 224 nm 波长下检测特女贞苷; 48~60 min, 在 250 nm 波长下检测大豆苷元; 其余条件同“2.1.1”项。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别取 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、特女贞苷和大豆苷元对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含 3'-羟基葛根素 35.80 μ g/mL、葛根素 203.89 μ g/mL、大豆苷 45.36 μ g/mL、特女贞苷 47.33 μ g/mL 和大豆苷元 11.06 μ g/mL 的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。

2.2.2 指纹图谱供试品溶液的制备 取 LTT 适量, 研细, 取粉末约 2 g, 精密称定, 置 50 mL 离心管中, 精密加入醋酸乙酯 35 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放至室温, 再称定质量, 用醋酸乙酯补足减失的质量, 摇匀, 5 000 r/min 离心 10 min, 精密量取上清液 25 mL, 蒸干, 残渣用甲醇溶解, 转移至 2 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得低极性部分供试品溶液。在低极性部分提取后的残渣中精密加入 60%甲醇溶液 35 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放至室温, 再称定质量, 用 60%甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得高极性部分供试品溶液。

2.2.3 定量测定供试品溶液的制备 取 LTT 粉末约 0.5 g, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加入适量 60%甲醇, 超声 30 min, 取出, 放至室温, 用 60%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 定量测定阴性对照溶液的制备 按照 LTT 的处方比例及制备工艺过程, 分别制备缺女贞子和缺葛根药材的阴性样品, 按照“2.2.3”项下方法制备阴性对照样品溶液。

2.3 低极性部分指纹图谱研究

2.3.1 精密度试验 取 S11 样品(批号 DK12444) 1 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 按“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 以大豆苷元(7 号峰)的保留时间和色谱峰面积为参照, 计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明仪器精密度良好。

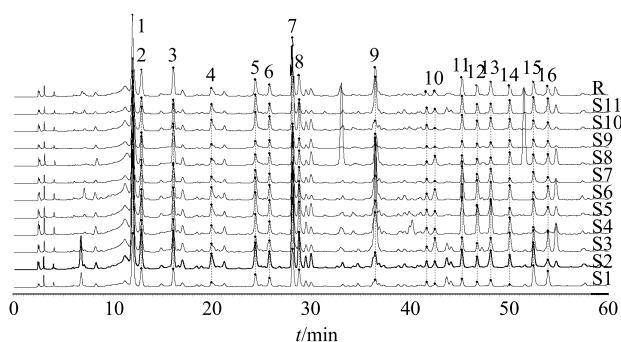
2.3.2 重复性试验 平行称取 6 份 S11 样品(批号 DK12444), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,

按“2.1.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图，以大豆苷元（7 号峰）的保留时间和色谱峰面积为参照，计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%，表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取 S11 样品（批号 DK12444）1 份，按“2.2.2”项下方法制备，放置于室温条件下，分别在 0、4、8、12、24 h 按“2.1.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图，以大豆苷元（7 号峰）的保留时间和色谱峰面积为参照，计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.4 低极性部分 HPLC 指纹图谱的建立与技术参数 根据 11 批 LTT 检测所得图谱，标定 16 个共有峰，共有峰峰面积占总峰面积 90%以上，采用中国药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件（2012 年版）进行分析，以 S1 样品为参照图谱，采用多点校正后进行自动匹配（时间窗宽度设为 0.10 min），用中位数法生成指纹图谱和对照指纹图谱，结果见图 1。对 11 批样品进行相似度计算，结果 S1~S11 的相似度分别为 0.934、0.954、0.913、0.951、0.964、0.966、0.965、0.907、0.953、0.942、0.932，结果表明各批次间相似性良好，质量稳定。

2.3.5 药材与制剂相关性分析 取 LTT 中 8 味原料药材白芷、葛根、女贞子、川芎、藁本、茺蔚子、



1-葛根素 2-3'-甲氧基葛根素 3-大豆苷 4-阿魏酸 7-大豆苷元
11-欧前胡素 13-异欧前胡素, 图 2 同
1-puerarin 2-3'-methoxypuerarin 3-daidzin 4-ferulic acid 7-daidzein
11-imperatorin 13-isoimperatorin, same as Fig. 2

图 1 11 批 LTT 低极性部分 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprints of low polarity constituents for 11 batches of LTT and its reference fingerprint (R)

辛夷和细辛，分别按 LTT 制备工艺制备样品，按“2.2.2”项方法制备各单味药材供试品溶液。分别取葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、阿魏酸、大豆苷元、欧前胡素、异欧前胡素对照品适量，精密称定，分别加甲醇制成含葛根素 96.77 μg/mL、3'-甲氧基葛根素 36.20 μg/mL、大豆苷 32.54 μg/mL、阿魏酸 25.62 μg/mL、大豆苷元 89.69 μg/mL、欧前胡素 37.51 μg/mL、异欧前胡素 25.40 μg/mL 的混合对照品溶液。分别吸取各单味药材供试品溶液和混合对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析，通过保留时间和 DAD 紫外吸收光谱对照分析，确认了指纹谱中 12 个特征共有峰的来源，其中 11、12、13 号峰来自白芷药材，1、2、3、7 号峰来自葛根药材，8 号峰来自女贞子药材，4、5、6 号峰来自川芎药材，4、15 号峰来自藁本药材，见图 2。

2.4 高极性部分指纹图谱研究

2.4.1 精密度试验 取 S11 样品（批号 DK12444）1 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，连续

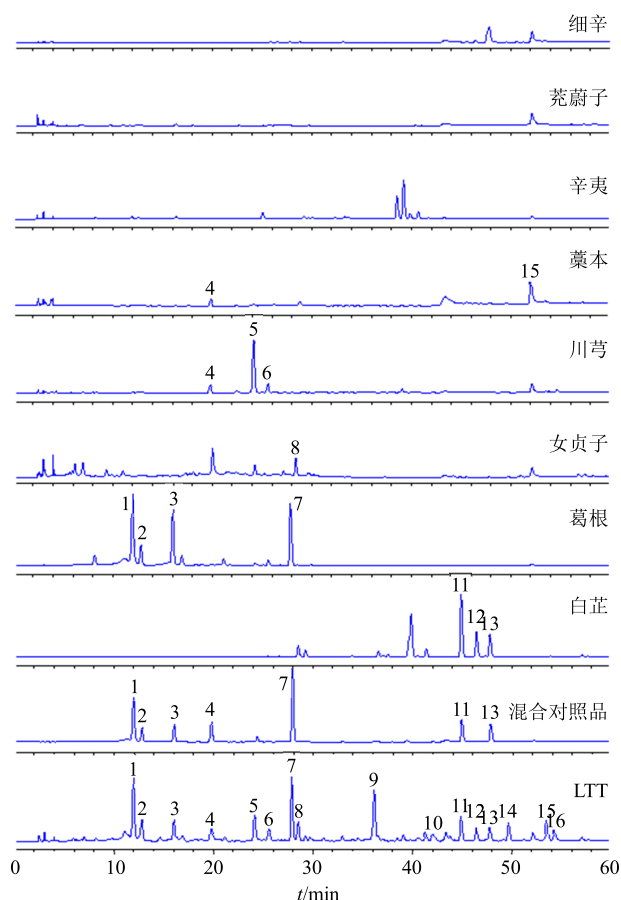


图 2 LTT 低极性指纹图谱中各共有峰归属

Fig. 2 HPLC of each common peak attribution in low polarity fingerprint and standard identification of LTT

进样 6 次, 按“2.1.2”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 以葛根素 (3 号峰) 的保留时间和色谱峰面积为参照, 计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明仪器精密度良好。

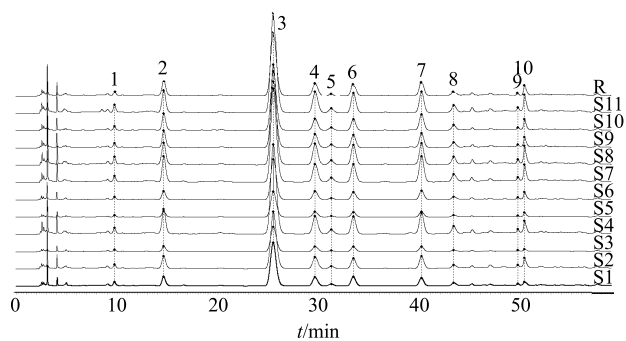
2.4.2 重复性试验 平行称取 6 份 S11 样品 (批号 DK12444), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.2”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 以葛根素 (3 号峰) 的保留时间和色谱峰面积为参照, 计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取 S11 样品 (批号 DK12444) 1 份, 按“2.2.2”项下方法制备, 放置于室温条件下, 分别在 0、4、8、12、24 h 按“2.1.2”项下色谱条件进行测定。记录色谱图, 以葛根素 (3 号峰) 的保留时间和色谱峰面积为参照, 计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.4 高级性部分 HPLC 指纹图谱的建立与技术参数 根据 11 批 LTT 检测所得图谱, 标定 10 个共有峰, 共有峰峰面积占总峰面积 90% 以上, 采用中国药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件 (2012 年版) 进行分析, 以 S1 样品为参照谱图, 采用多点校正后进行自动匹配 (时间窗宽度设为 0.10 min), 用中位数法生成指纹图谱和对照指纹图谱, 结果见图 3。对 11 批样品进行相似度计算, 结果 S1~S11 的相似度分别为 0.998、0.999、0.999、1.000、0.998、1.000、0.999、1.000、1.000、0.999、1.000, 结果表明各批次间相似性良好, 质量稳定。

2.4.5 药材与制剂相关性分析 取 LTT 中 8 味药材, 分别按 LTT 制备工艺制备样品, 按“2.2.2”项下方法制备各单味药材供试品溶液。分别取 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷和特女贞苷对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制成含 3'-羟基葛根素 167.96 μg/mL、葛根素 1 309.94 μg/mL、3'-甲氧基葛根素 55.78 μg/mL、大豆苷 194.59 μg/mL、特女贞苷 61.48 μg/mL 的混合对照品溶液。

分别精密吸取供试品溶液及各单味药材溶液, 注入高效液相色谱仪, 按“2.1.2”项下色谱条件测定, 根据保留时间和 DAD 紫外吸收光谱信息, 确



2-3'-羟基葛根素 3-葛根素 4-3'-甲氧基葛根素 7-大豆苷 10-特女贞苷, 图 4 同
2-3'-hydroxypuerarin 3-puerarin 4-3'-methoxypuerarin 7-daidzin 10-specnuezhenide, same as Fig. 4

图 3 11 批 LTT 高级性成分 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 3 HPLC fingerprints of high polarity constituents for 11 batches of LTT and its reference fingerprint (R)

认了指纹谱中 10 个特征共有峰的来源, 其中 2~9 号峰来自葛根药材, 1、10 号峰来自女贞子药材, 见图 4。

2.5 多成分定量测定

2.5.1 系统适用性试验 分别按照“2.2.3”项和“2.2.4”项下方法制备供试品溶液和阴性样品溶液, 按“2.1.3”项下的色谱条件测定。色谱图见图 5。

2.5.2 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2、4、8、12、16、20 μL, 按“2.1.3”项下的色谱条件进样测定, 以各指标成分的进样量为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 结果分别为 3'-羟基葛根素 $Y=2\ 358\ X+128.31$, $r=0.999\ 1$, 线性范围 71.60~716.00 ng; 葛根素 $Y=4\ 064.5\ X+254.51$, $r=0.999\ 4$, 线性范围 407.78~4\ 077.80 ng; 大豆苷 $Y=3\ 637.2\ X-3.292\ 9$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 90.72~907.20 ng; 特女贞苷 $Y=1\ 066\ X+30.51$, $r=0.999\ 1$, 线性范围 95.80~958.00 ng; 大豆苷元 $Y=6\ 231\ X-1.697\ 3$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 21.98~219.80 ng。

2.5.3 精密度试验 取批号为 EC12452 的 LTT 粉末约 0.5 g, 精密称定, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、特女贞苷和大豆苷元的峰面积, 分别计算这 5 个组分峰面积的 RSD, 结果发现这 5 个组分峰面积的 RSD 依次为 2.70%、0.52%、0.47%、2.04%、0.42%, 表明仪器精密度良好。

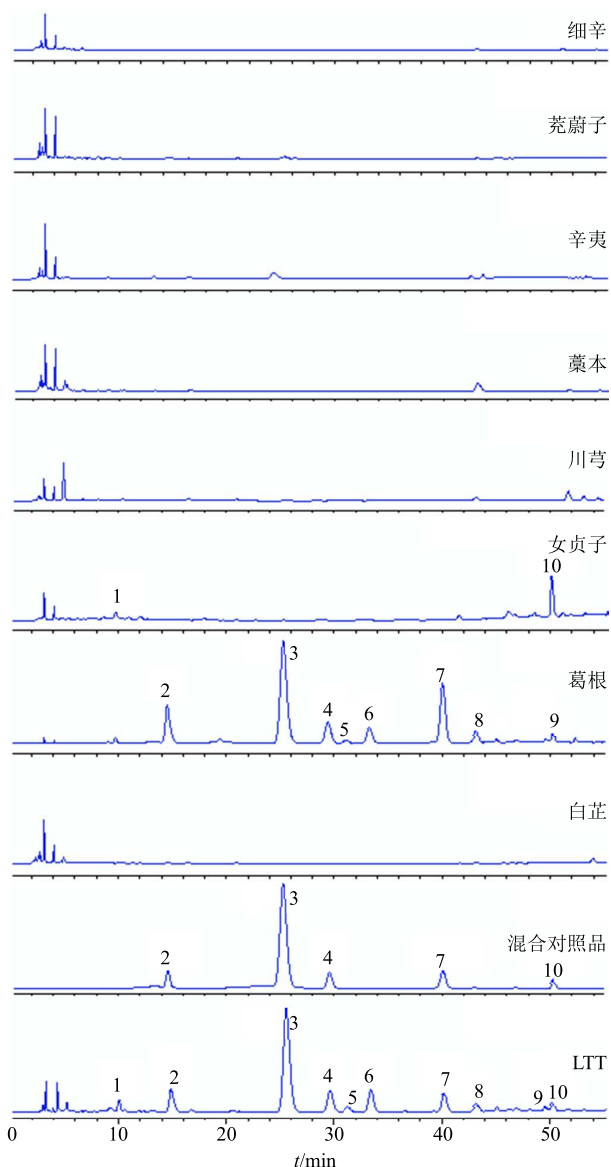
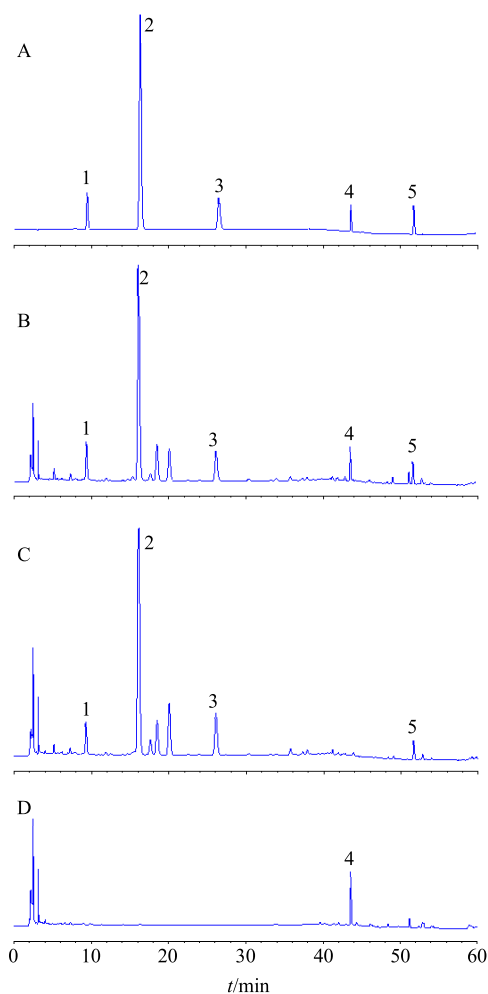


图 4 LTT 高极性指纹图谱中各共有峰归属

Fig. 4 HPLC of each common peak attribution in high polarity fingerprint and standard identification of LTT

2.5.4 稳定性试验 取批号为 EC12452 的 LTT 粉末约 0.5 g, 精密称定, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 室温下放置, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定, 结果 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、特女贞苷和大豆苷元峰面积的 RSD 依次为 0.49%、1.02%、0.72%、2.13%、0.65%, 结果表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.5 重复性试验 平行称取 6 份批号为 EC12452 的 LTT 粉末, 每份约 0.5 g, 精密称定, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进行测定, 计算 LTT 中 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、特女贞苷和大豆苷元的质量分数, 5 个组



1-3'-羟基葛根素 2-葛根素 3-大豆苷 4-特女贞苷 5-大豆苷元
1-3'-hydroxypuerarin 2-puerarin 3-daidzin 4-nuezhenide 5-daidzein

图 5 混合对照品 (A)、LTT 供试品 (B)、缺女贞子阴性 (C)、缺葛根阴性 (D) 样品的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of mixed reference substances (A), LTT sample (B), sample without *Ligustri Lucidi Fructus* (C), and sample without *Puerariae Lobatae Radix* (D)

分质量的 RSD 分别为 1.06%、0.64%、0.40%、1.22%、0.66%, 由此可知本法重复性良好。

2.5.6 加样回收率试验 取已测定指标成分量的 LTT (批号为 EC12452) 粉末 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 每份依次按样品中 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、特女贞苷和大豆苷元 5 个化合物量的 100% 加入相应的对照品, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 各进样 10 μL, 按“2.1.3”项下色谱条件进行测定, 计算 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷、特女贞苷和大豆苷元的回收率分别为 101.1%、97.8%、99.1%、97.8%、98.7%, RSD 分别为 1.38%、0.72%、0.75%、2.75%、0.70%。结果表明, 本法具

有良好的回收率。

2.5.7 供试品定量测定 取 10 个批次的 LTT 粉末约 0.5 g, 精密称定, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 依次进样, 按“2.1.3”项下色谱条件进行测定, 各批次结果见表 1。如表 1 所示各批次中 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷和大豆苷元的量较为稳定, 特女贞苷的量在 DK12444、DE12431 中偏低, 这可能由于所用的女贞子原料药材不同引起的。

表 1 10 批 LTT 定量测定结果

Table 1 Quantitative determination of 10 batches of LTT

批号	质量分数/(mg·mL ⁻¹)				
	3'-羟基葛根素	葛根素	大豆苷	特女贞苷	大豆苷元
DL12445	3.46	17.87	3.76	5.02	0.86
EA12448	3.21	17.71	3.61	5.31	0.78
EA12447	3.36	18.26	3.67	5.69	0.79
DK12444	3.84	21.24	3.75	1.87	0.82
EA12450	3.45	18.57	3.82	5.11	0.79
DE12431	3.11	18.06	3.51	1.40	0.66
EI12459	3.64	18.10	4.71	5.08	0.71
EC12452	3.08	17.80	3.77	5.07	0.78
EC12451	3.42	17.95	3.75	4.28	0.80
EI12458	3.34	17.87	4.70	5.44	0.71

3 讨论

LTT 是由 9 味药组成的中药复方, 成分复杂, 不同类型化合物极性跨度较宽, 即含有黄酮苷、环烯醚萜苷、苯乙醇苷类等水溶性的大极性化合物, 又含有黄酮苷元、香豆素等脂溶性的低极性化学成分。本实验采用极性分段法, 通过 2 种溶剂提取分离, 分别建立高、低极性指纹图谱, 2 张指纹图谱相互补充, 更为全面地反映 LTT 产品的质量。

使用二极管阵列检测器对样品进行 200~400 nm 的全波长扫描, 并对各波长下的色谱图进行分析比较, 结果表明, 低极性指纹谱中在 260 nm 下检测到峰的数目较多, 各峰分离良好且峰高比例协调, 故选择 260 nm 作为检测波长, 高极性指纹谱中, 测波长为 250 nm 时, 葛根素峰太高, 与其他峰比例不适宜, 在 260 nm 下色谱峰信息较多, 各峰比例适宜, 故也选择 260 nm 作为检测波长。并确定了 3'-羟基葛根素、葛根素、大豆苷和大豆苷元的检测波

长为 250 nm, 特女贞苷的检测波长为 224 nm。

本实验改变以往单一的质量评价模式, 向综合的质量评价模式发展, 所建立的方法稳定性好、结果可靠, 能够全面反映 LTT 定性、定量信息, 从而更准确地评价 LTT 质量, 以保证不同批次产品质量的均一性, 为企业大生产建立质量标准提供技术支持。

参考文献

- [1] 娄肖峰. 六经头痛片治疗偏头痛的临床观察 [J]. 中国医学工程, 2012, 20(2): 107.
- [2] 张 力, 张 海, 李钦青, 等. 六经头痛片质量标准 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 82-84.
- [3] 周 军, 赵 晨, 王 杰. HPLC 法测定六经头痛片中的胡薄荷酮 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(5): 500-502.
- [4] 白敦耀, 胡 盈, 李红蕾. 高效液相色谱法测定六经头痛片中欧前胡素的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(22): 1955-1956.
- [5] 黄可婧, 祝小静. 固相萃取-高效液相色谱法测定六经头痛片中马兜铃酸 I 的含量 [J]. 天津药学, 2015, 27(5): 9-11.
- [6] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [7] 李明月, 周立红, 章顺楠, 等. 加味逍遥提取物超高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 230-236.
- [8] 秦建平, 吴建雄, 郎 悦, 等. 痛宁凝胶的 HPLC-MS 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(4): 427-430.
- [9] 王春雷, 姜建伟, 侯桂兰. 急支糖浆 HPLC 特征指纹图谱研究及多成分定量测定 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4192-4197.
- [10] 陈 菲, 张奉苏, 刘训红, 等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱同时测定樟芝菌粉中 6 个核苷类化合物及其指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(12): 2097-2103.
- [11] 张晓燕, 龚苏晓, 游飞祥, 等. 基于 GC-MS 的六经头痛片挥发性化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3787-3794.
- [12] 晏 媛, 许重远, 刘世霆. 中药及其制剂指纹图谱质量标准的研究 [J]. 医药导报, 2005, 24(12): 1160-1162.
- [13] 李震宇, 王爱娜, 刘晓节, 等. 潞党参极性和非极性成分 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 山西医科大学学报, 2011, 42(1): 56-62.