



# 基于复方中药添加剂指纹图谱的多指标 成分定量方法研究

罗娟敏<sup>1,2</sup>, 蔡继宝<sup>1</sup>, 肖雪<sup>2</sup>, 付婵<sup>2</sup>, 廖堃<sup>1</sup>, 王义明<sup>2</sup>, 罗国安<sup>2\*</sup>

(1. 江西中烟工业有限责任公司 技术研发中心, 江西 南昌 330096

2. 清华大学 分析中心, 北京 100084)

**[摘要]** 目的: 应用 HPLC 色谱法建立复方中药添加剂的定量指纹图谱。方法: 以 phenomenex luna C<sub>18</sub> 反相色谱柱为分析柱, 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 全波长扫描。结果: 该色谱条件下复方中药添加剂定量指纹图谱具有良好的精密度、重复性、稳定性、回收率。结论: 本研究所建立的 HPLC 方法稳定可靠, 简便易行, 可用于复方中药添加剂中 7 种成分的同时定量, 为复方中药添加剂的质量评价和质量控制奠定了基础。

**[关键词]** 复方中药添加剂; 定量指纹图谱; 高效液相色谱

复方中药添加剂, 是以中药药理和药效实验为基础, 精选淫羊藿、补骨脂、大黄等 5 种具有补肾益肺的中草药, 以稀醇作溶剂, 结合现代先进的提取分离技术得到的提取物, 将其加入到烟草中, 在保证卷烟型卷烟特有的风格同时降低卷烟危害性。该复方中药添加剂具有增强机体细胞抗氧化功能、保护细胞膜、稳定细胞内环境等多种生理、生化功能和降低卷烟危害的作用及明确的机制<sup>[1]</sup>。

本研究在复方中药添加剂指纹图谱研究的基础上引入了“有效组分”的概念, 所谓“有效组分”是指中药中有类似化学性质的一大类化合物。有效组分是在药理药效学研究的基础上, 将中药的药效化合物群进行组合的结果<sup>[2]</sup>。根据复方中药添加剂中 3 类成分不同的光谱特性, 建立在 3 个紫外检测波长下同时测定其中 3 类组分(香豆素类、淫羊藿黄酮类、大黄蒽醌类)的含量, 从而为中药复方添加剂提供了更加合理、可靠的质控方法。

## 1 材料

Agilent 1100 series HPLC 高效液相色谱仪(包括 G13158 DAD 二极管阵列检测器、G1312A 低压二

元泵、柱温箱、Chemstation 化学工作站等), 乙腈(Merck 公司, 色谱纯), 甲酸(北京现代东方精细化工有限公司, 分析纯), MilliQ 超纯水(自制)。

淫羊藿苷(批号 110737-200415)、补骨脂素(批号 110739-200814)、异补骨脂素(批号 110738-200415)、芦荟大黄素(批号 110795-200806)、大黄酸(批号 110757-200206)、大黄素(批号 110756-200110)、大黄酚(批号 110796-201017)对照品均购自中国药品生物制品检定所。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称取各对照品, 分别溶于甲醇, 制成 5 个质量浓度水平的淫羊藿苷(88.6 44.3 17.72 3.544 0.708 8 mg·L<sup>-1</sup>)、补骨脂素(27.6 13.8 5.52 1.104 0.220 8 mg·L<sup>-1</sup>)、异补骨脂素(24.2 12.1 4.84 0.968 0.193 6 mg·L<sup>-1</sup>)、芦荟大黄素(20.2 10.1 4.04 0.808 0.161 6 mg·L<sup>-1</sup>)、大黄酸(28.4 14.2 5.68 1.136 0.227 2 mg·L<sup>-1</sup>)、大黄素(13.8 6.9 2.76 0.552 0.110 4 mg·L<sup>-1</sup>)、大黄酚(14.4 7.2 2.88 0.576 0.115 2 mg·L<sup>-1</sup>)对照品溶液。

**2.2 供试品溶液的制备** 精密吸取复方中药添加剂提取液, 50% 甲醇稀释 20 倍, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

**2.3 色谱条件** Phenomenex luna 5u C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 甲酸(A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 0~48 min 10%~34% B; 48~65 min 34%~82% B; 65~80 min 82%~100% B。

[稿件编号] 20101118011

[基金项目] 江西中烟工业有限责任公司项目(赣烟工科计 2009-14)

[通信作者] \* 罗国安, 教授, 博士生导师, Tel (010) 62781688, E-mail luog@mail.tsinghua.edu.cn

[作者简介] 罗娟敏, 硕士研究生, 研究方向中药方剂现代化研究, E-mail greenteal106@163.com

流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 柱温  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 全波长扫描。

**2.4 检测波长的选择** 全波长扫描结果表明, 香豆素类在  $246 \text{ nm}$  处有最大吸收; 淫羊藿苷类在  $270 \text{ nm}$  处有最大吸收; 大黄蒽醌类在  $254 \text{ nm}$  处吸收最强, 为使各组分达到吸收强、干扰小的目的, 选择在  $246 \text{ nm}$  测定香豆素类物质,  $270 \text{ nm}$  测定淫羊藿苷类,  $254 \text{ nm}$  测定大黄蒽醌类物质。不同波长下的复方中药添加剂定量指纹图谱见图 1,  $254 \text{ nm}$  下 7 个混合对照品色谱图见图 2。

(Y)对浓度(X)进行线性回归, 见表 1。

表 1 7 个有效成分的回归曲线与检测限

化合物	$t_R$ /min	回归方程	$r$	线性范围 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
淫羊藿苷	43.99	$Y = 1.723666X + 17.6442$	0.9997	0.70 ~ 88.6
补骨脂素	46.73	$Y = 5.896800X + 52.7403$	0.9992	0.22 ~ 27.8
异补骨脂素	48.82	$Y = 6.486208X + 46.2720$	0.9992	0.19 ~ 24.2
芦荟大黄素	57.02	$Y = 3.671935X - 6.09820$	0.9997	0.16 ~ 20.0
大黄酸	59.39	$Y = 2.877985X + 31.1504$	0.9994	0.23 ~ 28.4
大黄素	63.90	$Y = 3.293508X - 6.9293$	0.9991	0.11 ~ 13.8
大黄酚	67.90	$Y = 3.980425X + 2.5323$	0.9991	0.11 ~ 14.4

**2.6 精密度、重复性、稳定性试验** 取对照品溶液, 在优化的色谱条件下连续进样 5 次, 以峰面积为指标计算 RSD, 考察方法的精密度; 平行配制 5 份供试品溶液, 在优化的色谱条件下测定, 以峰面积为指标计算 RSD, 考察方法的重复性; 取供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 测定, 以峰面积为指标计算 RSD, 考察方法中的样品稳定性, 见表 2。

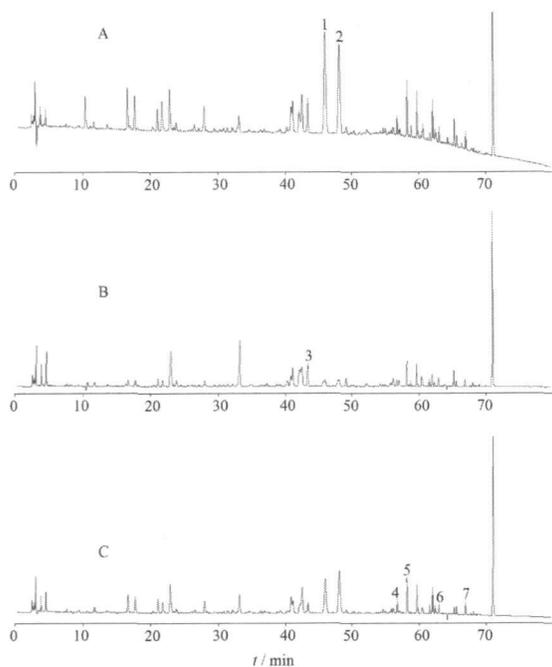
表 2 7 个有效成分的方法学考察 %

化合物	精密度 RSD	重复性 RSD	稳定性 RSD
淫羊藿苷	0.70	1.0	1.3
补骨脂素	0.90	1.5	1.7
异补骨脂素	1.1	2.1	2.1
芦荟大黄素	0.50	1.6	1.7
大黄酸	0.80	1.5	1.8
大黄素	1.0	2.3	2.2
大黄酚	0.90	1.6	1.8

**2.7 回收率试验** 精密量取已知含量的复方中药添加剂, 每组平行 6 份, 按一定比例分别添加 7 种对照品, 进样分析, 计算各成分的加样回收率, 见表 3。

表 3 有效成分加样回收率 ( $n = 6$ )

化合物	样品中量 / $\mu\text{g}$	添加量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 / %	RSD / %
淫羊藿苷	2.518	2.015	4.524	99.8	2.8
补骨脂素	1.623	1.300	2.891	98.9	2.3
异补骨脂素	1.402	1.122	2.510	99.4	1.3
芦荟大黄素	0.814	0.651	1.486	101	2.5
大黄酸	1.125	0.900	2.015	99.5	1.7
大黄素	0.712	0.570	1.272	99.2	1.5
大黄酚	0.664	0.532	1.210	101	2.0



A.  $246 \text{ nm}$ ; B.  $270 \text{ nm}$ ; C.  $254 \text{ nm}$ ; 1. 补骨脂素; 2. 异补骨脂素; 3. 淫羊藿苷; 4. 芦荟大黄素; 5. 大黄素; 6. 大黄素; 7. 大黄酚(图 2 同)。

图 1 不同波长下的复方中药添加剂定量指纹图谱

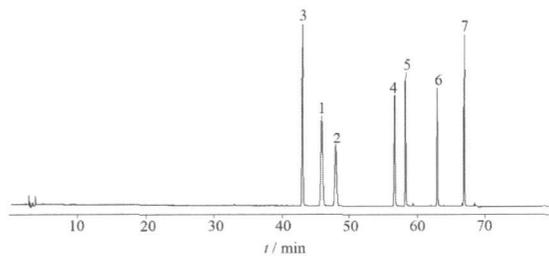


图 2  $254 \text{ nm}$  下 7 个混合对照品的 HPLC 图

**2.5 标准曲线和检测限** 在优化的色谱条件下, 各成分分别在 5 个浓度点, 平行测定 3 次, 用峰面积



## 2.8 样品的含量测定 按上述方法测定 3 批复方中药添加剂中 7 种成分的含量, 见表 4

表 4 3 批复方中药添加剂中 7 个成分的质量分数

No	g · L <sup>-1</sup>						
	淫羊藿苷	补骨脂素	异补骨脂素	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚
1	2 400	1 472	1 354	0 402	5 0 935	5 0 355	2 0 136
2	2 439	1 442	1 386	0 411	5 1 006	0 371	9 0 142
3	2 560	1 513	1 449	0 384	9 0 989	7 0 385	4 0 131

## 3 讨论

本文利用 HPLC-DAD 建立了复方中药添加剂多指标成分指纹图谱, 可在同一色谱条件下利用不同波长检测, 实现多类组分、多个成分的同时定量测定, 提高了效率, 并且其准确度和精密度均符合要求。

多指标成分定量指纹图谱与传统质量控制方法中的多指标成分测定不同, 是在“有效组分”理论指导下的多成分定量测定。传统的指标成分定量质量控制方法仅仅测定药材或成药中的 1~2 种有效成分(或指标成分), 由于缺乏相应的理论指导和化学成分和药效药理研究基础, 所测定的有效成分(指标成分)的专属性和系统性不能保证, 往往很难对药材或制剂的特性有一个全面的描述, 从而不能很

好地控制产品质量; 而在多指标成分定量指纹图谱中, 根据“有效组分”理论, 在相关化学、药理等研究基础上, 按照药材来源、药效功能和化学结构等把中药复杂分析体系中的大量组成系统地分成若干类“有效组分”, 每类“有效组分”代表着一定药效性质或质量特征, 在此基础上进行多指标成分定量分析, 必能更系统、更全面地展开产品质量控制。

多指标成分定量指纹图谱, 同时包含指纹图谱的定性和指标成分的定量功能, 这在同一张指纹图谱上(尤其是 UV 指纹图谱)往往难以实现。一方面根据指纹图谱的技术要求, 图谱需满足有效信息最大化, 另一方面根据定量分析的要求, 图谱需满足各指标成分(有效成分)达到最大响应的要求, 两者看似是矛盾的。但是随着二极管阵列检测器、多通道检测技术、质量型检测技术和仪器联用技术的发展, 这一问题正在逐步得以解决。

### [参考文献]

- [1] 米娜. 中草药金圣香降低卷烟危害及机制研究[D]. 北京: 军事医学科学院, 2007.
- [2] 罗国安, 王义明, 曹进, 等. 中药指纹图谱理论和实际应用[J]. 临床药物治疗杂志, 2006, 4(6): 6.
- [3] 罗国安, 梁琼麟, 张荣利, 等. 化学物质组学与中药方剂研究-兼析清开灵复方物质基础研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2006, 8(1): 6.

## Multi-component quantitative method of Chinese herbal additives based on fingerprint

LUO Juan<sup>1,2</sup>, CAI Jibao<sup>1</sup>, XIAO Xue<sup>2</sup>, FU Chan<sup>2</sup>, LIAO Kun<sup>1</sup>, WANG Yin<sup>2</sup>, LUO Guoan<sup>2</sup>  
 (1. Technology Center of China Tobacco Jiangxi Industrial Co., Ltd., Nanchang 330096 China;  
 2. Analysis Center, Chemistry Department of Tsinghua University, Beijing 100084 China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a full-quantified fingerprint method for analyzing Chinese herbal additives by HPLC. **Method** A HPLC in combination with PDA detector was applied with a phenomenex luna C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column by gradient elution using acetonitrile-0.1% formic acid solution as the mobile phase. The flow rate was 1 mL · min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was set at full spectrum scan. **Result** According to the selected chromatographic conditions, the full-quantified fingerprint of the Chinese herbal additive has good precision, reproducibility, stability and recovery. **Conclusion** The HPLC method developed for simultaneous determination of seven compounds is simple and valid. It can be used for quality evaluation and quality control of Chinese herbal additive and its processing products.

**[Key words]** Chinese herbal additive; full-quantified fingerprint; HPLC

doi 10.4268/cjmm.20111009

[责任编辑 马超一]

• 1297 •